

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Microbiología**



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización del brote de linfogranuloma venéreo en la Comunidad  
de Madrid e impacto global en la epidemiología molecular de  
"Chlamydia trachomatis"**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Mario José Rodríguez Domínguez**

Directores

Juan Carlos Galán Montemayor  
Rafael Cantón Moreno

**Madrid, 2016**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

Departamento de Microbiología



**TESIS DOCTORAL**

**“CARACTERIZACIÓN DEL BROTE DE LINFOGRANULOMA VENÉREO EN LA  
COMUNIDAD DE MADRID E IMPACTO GLOBAL EN LA EPIDEMIOLOGÍA  
MOLECULAR DE *Chlamydia trachomatis*”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**D. Mario José Rodríguez Domínguez**

DIRECTORES

**Dr. Juan Carlos Galán Montemayor**

**Dr. Rafael Cantón Moreno**

**MADRID, 2015**



**El Dr. D. Juan Carlos Galán Montemayor, Jefe de Sección de Virología y el Dr. D. Rafael Cantón Moreno, Jefe del Servicio de Microbiología, del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid,**

CERTIFICAN QUE: **D. MARIO JOSÉ RODRÍGUEZ DOMÍNGUEZ** ha realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, bajo su dirección, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor, con el título:

**“CARACTERIZACIÓN DEL BROTE DE LINFOGRANULOMA VENÉREO EN LA COMUNIDAD DE MADRID E IMPACTO GLOBAL EN LA EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Chlamydia trachomatis*”**

Y para que así conste, firmamos la presente certificación en Madrid, 2015

**Fdo. Dr. Juan Carlos Galán Montemayor**

**Fdo. Dr Rafael Cantón Moreno**





**A mis padres**  
**A Susi**  
**Para Mario y Alex**



“Dejamos de temer aquello que se ha aprendido a entender”  
Marie Curie

“La recompensa se encuentra en el esfuerzo, no en el resultado.  
Un esfuerzo total es una victoria completa”  
Mahatma Gandhi

“cuando creíamos que teníamos todas las respuestas,  
de pronto, cambiaron todas las preguntas”  
Mario Benedetti



## **AGRADECIMIENTOS**

*“Acercarse es un comienzo, mantenerse juntos es progreso, trabajar juntos es éxito”*

*Henry Ford*

El tiempo transcurrido en el desarrollo de esta tesis ha sido una oportunidad de conocer, interaccionar y aprender de diferentes personas provenientes de distintos ámbitos y con diferentes formas de ver las cosas. Como acostumbro en mi vida cotidiana, de todos aprendí algo, bueno o no tan bueno, que sin duda llevaré en “mi mochila”. Me gustaría agradecer en estas páginas a aquellas personas que directa o indirectamente han participado o me han servido de apoyo en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Juan Carlos Galán, director de esta tesis. Le tengo que agradecer tantas cosas que no sabría por dónde empezar, gracias con mayúsculas. Su constancia, perfeccionismo y personal forma de ver las cosas, aunque a veces me ha puesto “al borde del infarto” (como buen director de tesis), finalmente no ha hecho otra cosa que enriquecerme.

Al Dr. Rafael Cantón, codirector de la tesis y mi Jefe de Servicio. Por confiar y contar conmigo y por darme el empujón necesario, en el momento adecuado, hacia esta profesión. Su perseverancia y extraordinaria capacidad de trabajo me sirven de ejemplo y motivación.

A los compañeros del Centro Sandoval, Jorge del Romero, Blanca Menéndez, Teresa Puerta, Carmen Rodríguez... Por su ayuda, por sus ánimos, por su cariño, por su confianza. Como si de un flechazo se tratara, poco tiempo bastó para entablar una relación cuyo reflejo es esta tesis y que espero duré muchos, muchos años.

A José María González-Alba (Chema), “genio y figura hasta la sepultura”. Si la tesis tuviera créditos él podría figurar como protagonista. Sin su capacidad para entender y desmenuzar los entresijos de la bioinformática y la filogenia, nunca habría sido capaz de acabar esta tesis.

A los facultativos del Servicio de Microbiología del Ramón y Cajal, por todo lo que he aprendido. Mención especial al Dr. Javier González Sáinz por su elegancia, sensatez y disponibilidad en el desarrollo de esta tesis. También por su colaboración, a la doctora Teresa Hellín, responsable de la Unidad de ITS del Hospital Ramón y Cajal.

Como no, a mis compañeros residentes y de investigación, a todos, pero especialmente a mis coetáneos mayores y pequeños, paño de lágrimas y fuente de risas. Con ellos he compartido los mejores momentos de estos años en el Hospital y con algunos de ellos las rampas de esta profesión. Debo nombrar a Ana “Rizos” y a Laurita, parte de su trabajo está reflejado en estas páginas.

Al personal técnico, en especial (que me perdonen los demás) a María, Paqui y Puri. Por su ayuda desinteresada, por su apoyo y por su cariño. Por fin la acabé chicas!!!

A Abbott Molecular, por su ayuda en la implementación del diagnóstico de LGV, en especial a Victoria Martín, por su diligencia.

Y por último a las personas de mi vida “no profesional” que por el mero hecho de estar me proporcionan la tranquilidad necesaria para afrontar cualquier reto.

A mis amigos de toda la vida, los de verdad. Compartir un momento con vosotros es la mejor medicina para los bajones. Gracias por compartir una cosa más conmigo.

A mis padres, por su esfuerzo, por darlo todo y por todo lo que me han transmitido, aun sin darse cuenta,

A Susi, mi melena de Sansón y mi talón de Aquiles. Gracias por sufrirme, acompañarme y quererme.

Y a Mario y Álex, mi vida entera. Nada me hace más feliz que ver una sonrisa en vuestra cara. No soy maestro de nada, sólo espero que conservéis con cariño esta tesis y os sirva como ejemplo de que con esfuerzo, constancia e ilusión podréis conseguir lo que os propongáis.

Seguro que me olvido de alguien, vayan mis disculpas por adelantado...

# ÍNDICE

<b><u>RESUMEN</u></b> .....	1
<b><u>ABSTRACT</u></b> .....	3
 <b><u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u></b>	
<b>1. LAS INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL (ITS) EN LA HISTORIA</b> .....	7
<b>2. IMPORTANCIA DE LAS ITS</b> .....	8
<b>3. AGENTES INFECCIOSOS IMPLICADOS EN LAS ITS</b> .....	10
<b>3.1. <i>Chlamydia trachomatis</i> como agente infeccioso relacionado con ITS</b> .....	13
3.1.1. <i>Manifestaciones clínicas de las infecciones por C.trachomatis</i> .....	13
3.1.1.1. <i>Infecciones por genotipos urogenitales invasivos: Linfogranuloma venéreo (LGV)</i> .....	14
3.1.1.2. <i>Infecciones por genotipos urogenitales no invasivos</i> .....	15
<b>4. IMPLEMENTACION DE ESTRATEGIAS BIOSANITARIAS Y DISPONIBILIDAD DE NUEVAS TECNOLOGÍAS PARA FACILITAR LA PREVENCION DE LAS ITS</b> .....	18
<b>4.1. Políticas de prevención</b> .....	18
<b>4.2. Mejoras diagnósticas</b> .....	18
4.2.1. <i>Programas de cribado</i> .....	20
4.2.2. <i>Sistemas moleculares de identificación de C. trachomatis</i> ..	21
4.2.2.1. <i>Sistemas de asignación de las diferentes variantes de C. trachomatis</i> .....	22
4.2.2.1.1. <i>El valor de MOMP</i> .....	24
4.2.2.1.2. <i>El valor de <i>pmpH</i> o la búsqueda de genes que correlacionen genotipo y patotipo</i> .....	26
4.2.2.2. <i>Impacto de la implementación de las técnicas moleculares en el diagnóstico de las infecciones por C. trachomatis</i> .....	29
<b>4.3. Epidemiología de la ITS</b> .....	31
4.3.1. <i>Vigilancia epidemiológica de C. trachomatis</i> .....	34
4.3.1.1. <i>Poblaciones vulnerables</i> .....	35
4.3.2. <i>Aplicación de las herramientas bioinformáticas al estudio de las ITS</i> .....	37
<b>5. ANEXO-I: PUBLICACION</b> .....	39



## **CAPÍTULO 1:**

### **CARACTERIZACIÓN DE UN BROTE DE LGV EN LA COMUNIDAD DE MADRID**

#### **INTRODUCCIÓN**

##### **1. TRANSMISIÓN DE LAS ITS EN FORMA DE BROTES**

###### **EPIDÉMICOS.....49**

##### **2. BROTES EPIDÉMICOS POR *C. trachomatis*.....50**

##### **3. BROTE DE LGV EN EUROPA.....51**

###### **3.1. Antecedentes de los casos de LGV.....51**

###### **3.2. Cambio epidemiológico: acumulación de casos de LGV en Europa.....52**

###### **3.2.1. Características clínico-epidemiológicas del brote de LGV en**

###### **Europa.....54**

##### **4. DESCRIPCIÓN DE CASOS DE LGV EN ESPAÑA.....55**

#### **OBJETIVO.....57**

#### **MATERIAL Y MÉTODOS**

##### **1. Periodo de estudio y centros participantes.....58**

##### **2. Muestras estudiadas.....58**

##### **3. Análisis clínico epidemiológico.....59**

##### **4. Diagnóstico microbiológico de *C. trachomatis*.....59**

##### **5. Detección de genotipos asociados a LGV.....60**

##### **6. Secuenciación de los genes *pmpH* y *ompA*.....61**

##### **7. Análisis de secuencias.....62**

##### **8. Selección del modelo evolutivo para el análisis filogenético.....63**

###### **9. Análisis filogenético por el método de diagrama de redes (median joining network).....63**

##### **10. Análisis filogenético y temporal (BEAST).....64**

#### **RESULTADOS**

##### **1. Caracterización microbiológica del brote de LGV.....65**

##### **2. Validación de la PCR en tiempo real del gen *pmpH*.....66**

##### **3. Incidencia de LGV en la Comunidad de Madrid durante el periodo de estudio.....68**

##### **4. Caracterización epidemiológica del brote de LGV, basado en el análisis filogenético del gen *ompA* .....70**

##### **5. Diferencias en la presentación clínica de las variantes L2b y L2/L2f.....72**

##### **6. Análisis de filogenia datada.....73**

#### **DISCUSIÓN.....75**

#### **ANEXO-II:**

#### **PUBLICACION.....79**

#### **ANEXO-III: Seguimiento de la evolución del brote de LGV .....91**

**CAPITULO 2:**  
**PREVALENCIA DE COINFECCIONES POR GENOTIPOS INVASIVOS**  
**Y NO INVASIVOS DE *Chlamydia trachomatis***

**INTRODUCCIÓN**

<b>1. IMPACTO ECOLÓGICO-EVOLUTIVO DE LA CO-CIRCULACION DE VARANTES INVASIVAS Y NO INVASIVAS DE <i>C. trachomatis</i></b>	<b>97</b>
1.1. Tasas de infecciones mixtas	97
1.2. Impacto de las infecciones asintomáticas en la generación y frecuencia de infecciones por nuevas variantes	98
<b>2. PREVALENCIA DE LAS INFECCIONES POR GENOTIPOS NO INVASIVOS DE <i>C. trachomatis</i></b>	<b>99</b>
2.1. Tracoma	99
2.2. Genotipos urogenitales no invasivos	100

<b>OBJETIVO</b>	<b>102</b>
-----------------	------------

**MATERIAL Y MÉTODOS**

1. Muestras estudiadas	102
2. Detección de infecciones simultaneas por genotipos invasivos y no invasivos de <i>Chlamydia trachomatis</i> en grupo I, basado en el gen <i>pmpH</i>	102
4. Restricción, clonado y secuenciación de <i>pmpH</i> en muestras con presencia simultánea de genotipos invasivos y no invasivos	104
5. Diseño de una PCR múltiple para determinar infecciones por >1 genotipo no invasivo en muestras del grupo II	104
6. Secuenciación de genes <i>pmpH</i> y <i>ompA</i> en clones sugerentes de ser variantes recombinantes	105
7. Análisis filogenético	106
8. Detección de eventos de recombinación	106

**RESULTADOS**

1. Detección de coinfecciones por genotipos invasivos y no invasivo	107
2. Identificación de genotipos no invasivos en muestras con coinfecciones basado en los genes <i>pmpH</i> y <i>ompA</i>	107
3. Caracterización de genotipos urogenitales no invasivos en muestras clínicas donde la presencia de LGV fue excluida	109
4. Análisis temporal de la distribución de genotipos	109
5. Reconstrucción filogenética e identificación de nuevos recombinantes	110
6. Caracterización molecular y evolutiva de la nueva variante recombinante	112

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>113</b>
------------------	------------

<b>ANEXO-IV: PUBLICACIÓN</b>	<b>118</b>
------------------------------	------------

### **CAPÍTULO 3:**

## **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, DISTRIBUCIÓN Y EVOLUCIÓN (A TIEMPO REAL) DE LA VARIANTE RECOMBINANTE IDENTIFICADA EN POBLACIÓN DE MADRID**

### **INTRODUCCIÓN**

1. IMPORTANCIA DEL CICLO BIOLÓGICO DE <i>C. trachomatis</i> .....	135
2. POSICIÓN FILOGENÉTICA DE <i>C. trachomatis</i> . ¿AISLAMIENTO GENÉTICO?.....	137
3. EL PANGENOMA DE <i>Chlamydia</i> Y EL GENOMA DE <i>C. trachomatis</i> .....	140
4. FILOGENIA Y EVOLUCIÓN EN <i>C. trachomatis</i> .....	144
4.4.1. Sobre el origen y evolución de las variantes de <i>C.</i> <i>trachomatis</i> .....	145
5. INFLUENCIA DE LA RECOMBINACIÓN Y LA MUTACIÓN EN LA EVOLUCIÓN DE <i>C. trachomatis</i> .....	149
6. PROPUESTA DE GENES QUE DEFINAN LOS EVENTOS DE MACRO Y MICROEVOLUCIÓN.....	151
7. APLICACIÓN DEL MODELO PROPUESTO A LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y EVOLUCIÓN FILOGENÉTICA DE LA VARIANTE DESCRITA EN EL CAPITULO ANTERIOR.....	153

<b>OBJETIVO</b> .....	155
-----------------------	-----

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

1. Periodo de estudio y muestras estudiadas.....	156
2. Diseño de PCR para detección de la variante recombinante.....	156
3. Amplificación y secuenciación de los genes <i>ompA</i> y <i>pmpH</i> .....	157
4. Amplificación y secuenciación de genes relacionados con tropismo/patogenia.....	157
5. Análisis filogenético.....	160

### **RESULTADOS**

1. Distribución espacio-temporal de la variante recombinante a lo largo del período de estudio. ....	161
2. Evolución genómica de la cepa recombinante detectada en Madrid a lo largo del período de estudio.....	162
3. Análisis filogenético de genes relacionados con tropismo/patogenia.....	164
4. Posible origen evolutivo de genotipo recombinante detectado en Madrid.....	164

<b>DISCUSION</b> .....	169
------------------------	-----

<b>ANEXO-V</b> .....	173
----------------------	-----

<b>EPILOGO</b> .....	177
----------------------	-----

<b>CONCLUSIONES</b> .....	181
---------------------------	-----

<b>ANEXO-VI: PUBLICACION</b> .....	183
------------------------------------	-----

<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	187
---------------------------	-----

## **INDICE DE FIGURAS**

**Figura 1.-** Cadena de transmisión a partir de trabajadoras/es del sexo

**Figura 2.** Esquema de los distintos métodos de caracterización de genotipos de CT

**Figura 3.** A) Modelo de la estructura de la envuelta de Chlamydia. B) Representación de la estructura de MOMP

**Figura 4.** Árbol filogenético de Neighbor-joining. Basado en el gen *ompA*.

**Figura 5.** Distribución a lo largo del genoma de CT de los genes analizados

**Figura 6.** Árboles filogenéticos de NJ basados en las secuencias nucleotídicas de los genes *pmpH* (A), *pmpI* (B) y *pmpE* (C)

**Figura 7.** Diseño de PCR en tiempo real, basado en la delección de 36pb presente en el gen *pmpH*, para la detección específica de genotipos invasivos asociados a LGV

**Figura 8.-** Distribución por nivel de implementación de la vigilancia de infecciones por *C.trachomatis* en los diferentes países de Europa

**Figura 9.-** Evolución por áreas geográficas de OMS de las tres principales ITS bacterianas en el periodo 2005-2008

**Figura 10.-** Evolución de las tres principales ITS en Europa y EEUU entre los años 2005 y 2011

**Figura 11.** Casos de infecciones por CT por cada 100.000 personas en 9 países de la Unión Europea. Fuente: ECDC (Sexually transmitted infections in Europe, 2012).

**Figura 12.** Evolución temporal de los casos de *C. trachomatis* notificados al ECDC

**Figura 13.** A) Incidencia de Chlamydia trachomatis en Suecia desde 1991 a 2007. B) Plásmido de la variante sueca.

**Figura 14.** Número de casos de LGV confirmados en Holanda y Reino Unido

**Figura 15.** Evolución temporal del brote de LGV en Europa

**Figura 16.** Casos de LGV detectados en Barcelona entre 2007 y 2011

**Figura 17.** Distribución temporal de los casos de LGV a lo largo del periodo de estudio.

**Figura 18.** Árbol filogenético obtenido por el método de neighbor-joining, con las 45 secuencias del gen *pmpH* de nuestras muestras.

**Figura 19.** Análisis por diagrama de redes de 75 secuencias de aislados de LGV basado en *ompA*/MOMP

**Figura 20.** Árbol de filogenia datada por análisis Bayesiano

**Figura S1a.** Evolución del número de casos de LGV entre los años 2009 y el primer semestre del año 2014

**Figura S1b.** Porcentaje de casos de LGV por tipo de muestra. Periodo 2011-2014.

**Figura 21.** Distribución de genotipos en los distintos estudios realizados en países europeos.

**Figura 22.** Distribución de los distintos genotipos de CT por continentes

**Figura 23.-** Esquema de PCR en tiempo real para detección de genotipos L asociados a LGV y genotipos urogenitales no invasivos en muestras con infección mixta

**Figura 24.** Reconstrucción filogenética de los diferentes genotipos de *C. trachomatis* basado en los fragmentos del gen *pmpH*

**Figura 25.** Reconstrucción filogenética, por el método de máxima verosimilitud, del concatenado de genes *pmpH-ompA*

**Figura 26.** Ciclo de desarrollo biológico de *Chlamydia*

**Figura 27.** Situación filogenética del phylum *Chlamydiae*

**Figura 28.** Relación filogenética de las nuevas familias del phylum *Chlamydiae* descritas.

**Figura 29.** Análisis filogenético de las 8 especies de *Chlamydia*, basado en la secuencia concatenada de 7 genes *housekeeping*

**Figura 30.** Representación de la tasa de recombinación sobrerrepresentada sobre el árbol filogenético de la vida descrito de Ciccarelli en 2006

**Figura 31.** El genoma-core y el pan-genoma de *Chlamydiae*

**Figura 32.** Árbol filogenético de 16S rDNA de *Waddlia* (W), *Simkania* (S) y *Parachlamydia* (P)

**Figura 33.-** Árbol filogenético obtenido por el método de máxima verosimilitud de genomas completos de CT, excluyendo recombinación

**Figura 34.** Mapeo cromosómico de los *loci* implicados en la evolución direccional de *C. trachomatis*

**Figura 35.** Árbol filogenético concatenado de los 234 genes del genoma mínimo,

**Figura 36.** Reconstrucción filogenética basada en la topología del árbol de la figura 35

**Figura 37.** A) Representación filogenética de los genotipos de cada patotipo descritos en *C. trachomatis*, basados en el análisis de genomas completos. B) Recombinantes de *C. trachomatis* obtenidos, en condiciones de laboratorio después de pases seriados en presencia de antibiótico.

**Figura 38.** Disposición de los genes propuestos para la realización de estudios de epidemiología molecular a lo largo del cromosoma bacteriano de *C. trachomatis*

**Figura 39.** Diseño de PCR específica en base al evento de recombinación presente en la nueva variante recombinante

**Figura 40.** Esquema de la localización cromosómica de los genes estudiados

**Figura 41.** A) Evolución temporal de la proporción encontrada de la variante recombinante en el total de muestras analizadas B) Porcentaje, por tipo de muestra, de la variante recombinante encontrada respecto al total de muestras analizadas.

**Figura 42.** Análisis filogenético obtenido por el método BEAST del gen *pmpH*

**Figura 43.** Análisis filogenético por el método BEAST del gen *ompA*

**Figura 44.** Análisis por el método BEAST del concatenado de genes (*incE-F*, *rs2*, *pmpH*, *tarP* y *lysS*)

**Figura 45.** Análisis filogenético por el método BEAST del concatenado de todos los genes secuenciados (*ompA*, *incE-F*, *rs2*, *pmpH*, *tarP* y *lysS*)

**Figura 46.** Representación esquemática de la hipótesis espacio-temporal de la diversificación de las cepas analizadas en este estudio

**Figura 47.** Análisis filogenético del concatenado de los genes *rs2* y *lysS*

**Figura 48.** Representación esquemática de la transferencia de genes inferida del análisis de genomas completos de la figura S2c

**Figura S2a.** Análisis filogenético por el método BEAST del segmento genético *incE-incF*

**Figura S2b.** Árbol filogenético obtenido por el método BEAST del gen *tarP*.

**Figura S2c.** Análisis filogenético por el método BEAST del gen *rs2*.

**Figura S2d.** Árbol filogenético por el método BEAST del gen *lysS*



## **INDICE DE TABLAS**

**Tabla 1.** Agentes infecciosos implicados en infecciones de transmisión sexual

**Tabla 2.** Resumen de los distintos cuadros clínicos causados por *Chlamydia trachomatis*

**Tabla 3.** Cebadores y sondas empleados en la confirmación de la presencia de CT en la muestra clínica y detección de genotipos asociados a LGV

**Tabla 4.** Cebadores empleados en la secuenciación de los genes *ompA* y *pmpH*

**Tabla 5.** Nombre y número de acceso de las secuencias de referencia obtenidas de la base de datos del NCBI

**Tabla 6.** Características clínicas de los 94 pacientes con diagnóstico de LGV, en relación al tipo de muestra

**Tabla 7.** Características clínicas de los casos en función de la variante L2/L2f o L2b detectada.

**Tabla S1.** Distribución de las variantes L2/L2f y L2b por tipos de muestra.

**Tabla 8.** Cebadores para asignación de genotipos basados en la secuencia del gen *ompA*

**Tabla 9.** Cebadores diseñados para amplificación y secuenciación de genes relacionados con el patotipo

**Tabla 10.** Porcentaje de coinfecciones en pacientes con o sin infección simultánea por LGV

**Tabla 11.** Distribución de genotipos por periodos de tiempo en muestras no LGV.





## **ABREVIATURAS**

ADNr: Ácido desoxiribonucleico ribosomal

ATP: Adenosin trifosfato

BrEt: Bromuro de Etidio

CAM: Comunidad Autónoma de Madrid

CDC: Centers for Disease Control

CE: Cuerpo elemental

CEP: proteína de envuelta

CR: Cuerpo reticular

CT: Chlamydia trachomatis

dNTPS: desoxinucleótidos trifosfato

dN/dS: proporción entre cambios nucleotídicos no sinónimos y sinónimos

ECDC: European Centres for Disease Control

EIP: Enfermedad inflamatoria pélvica

ESSTI: European Surveillance of Sexually Transmitted Infections

ETS: Enfermedad de transmisión sexual

Euro-GASP: Programa Europeo de vigilancia de la Resistencia antimicrobiana en gonococo

GARPR: Global AIDS Response Progress Reporting

GTR: General Time Reversible

HK: gen conservado (housekeeping)

HKY: modelo evolutivo de Hasegawa-Kishino-Yano

HP: Proteína hipotética

HSH: Hombres que tienen sexo con hombres

I: proportion of invariable sites

IGR: Región intergénica

ITS: Infecciones de transmisión sexual

LGV: Linfogranuloma venéreo

LPS: Lipopolisacárido

MCMC: cadena de Markov-Montecarlo

MDG: Millenium Development Goals (OMS)

mM: milimolar

MIF: Microinmunofluorescencia

ML: Método de máxima verosimilitud

MLST: Multilocus Sequence Typing

MOMP: proteína mayor de membrana de CT

NCBI: National Center for Biotechnology

NG: Neisseria gonorrhoeae

NJ: Método Neighbour joining

nM: nanomolar

No-LGV: genotipos no invasivos de CT

nvCT: variante sueca de CT

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: pares de bases

PBPs: penicillin binding proteins

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PMP: Proteína polimórfica de membrana

POC: Point of care

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

RFLP: Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

RyC: Hospital Ramón y Cajal

SNP: Small nucleotide polymorphism (mutación puntual)

TP: Treponema pallidum

VEB: Virus Epstein Barr

VD: Dominio variable

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

VHE: Virus de la hepatitis E

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VPH: Virus del papiloma humano

## **RESUMEN**

Según datos de la Organización Mundial de la Salud, *Chlamydia trachomatis* es una de las principales causas de infecciones de transmisión sexual a nivel mundial. El linfogranuloma venéreo (LGV) es un síndrome clínico causado por los genotipos invasivos de *C. trachomatis* (L1-L3), considerado endémico de África, Asia y Sudamérica. En el año 2003 se describe una acumulación de casos de LGV en Holanda causados por una nueva variante, L2b, extendiéndose en los años sucesivos a casi la totalidad de países europeos y en menor medida a Estados Unidos y Australia. En el primer capítulo de esta Tesis, el objetivo fue constatar la presencia de casos de LGV en la Comunidad de Madrid y realizar la caracterización molecular y epidemiológica de los casos encontrados. La epidemiología encontrada difiere de la descrita en el resto de países, encontrando la circulación simultánea de dos variantes predominantes, L2b como en el resto de Europa y L2/L2f, característica de Sudamérica y sólo descrita de forma ocasional en Europa. Preocupantemente cada año incluido en el estudio desde 2009 a 2014 se observa un incremento contante de los porcentajes de casos de LGV entre las infecciones causadas por *C. trachomatis*, desde <7% hasta >19% (incluidos casos en mujeres). El seguimiento temporal del brote confirma un desplazamiento de la variante L2b por la L2/L2f, probablemente debido a la naturaleza poco o nada sintomática de esta última. En el capítulo 2 se cuantifica la prevalencia de infecciones mixtas por diferentes genotipos invasivos y no invasivos, para estimar el impacto en la epidemiología local de los casos de LGV. Se encuentran los porcentajes más elevados descritos hasta la fecha en países industrializados, entre genotipos invasivos y no invasivos (10,9%) y uno de los más altos entre genotipos no invasivos (14,6%) que se asemeja más a países en vías de desarrollo. En el contexto de este estudio se identifica una variante recombinante entre genotipo G y LGV, en muestras rectales de hombres que tienen sexo con hombres, con pocos o ningún síntoma. Este aislado fue descrito en Seattle de forma ocasional en el año 2000. En el tercer capítulo, se estudia la evolución temporal en la prevalencia de la variante recombinante encontrada, aumentando de un 27,6% en el periodo 2010-2013 a un 38,6% durante 2014-2015, y detectándose por primera vez en localización no rectal y en individuos heterosexuales. Los estudios de caracterización molecular y reconstrucciones filogenéticas realizados con esta cepa recombinante, permitieron identificar dos clados o nodos de transmisión en Madrid asociados a esta cepa y en varios clones de cada uno de esos nodos se observó un reemplazamiento del gen *ompA* (define genotipo) del genotipo G por *ompA* del genotipo J. Este evento coincidió con el cambio epidemiológico, producido a partir de 2014,

en cuanto a la población afectada (individuos heterosexuales y localización no rectal), pudiendo haber contribuido este reemplazamiento a un cambio en el tropismo celular. También se discute el papel de los individuos puente entre redes sexuales en la diseminación de nuevas variantes.

## **ABSTRACT**

According to World Health Organization, *Chlamydia trachomatis* is a leading cause of sexually transmitted infections worldwide. Lymphogranuloma venereum (LGV) is a clinical syndrome caused by invasive genotypes of *C. trachomatis* (L1-L3), considered endemic in Africa, Asia and South America. In 2003 an accumulation of cases of LGV was detected in the Netherlands caused by a new variant, L2b, ranging in subsequent years to practically all European countries and sporadic cases have been also described in USA and Australia. In the first chapter of this Thesis the objective was to verify the presence of cases of LGV in Madrid and make the molecular and epidemiological characterization of the cases found. The epidemiology found differs from that described in the other countries, characterized the simultaneous presence of two predominant variants, L2b described in Europe and L2/L2f characteristic in South America and only occasionally in Europe. Worryingly during all years of this study (2009-2014), we observed a continuous increase in the percentage of LGV cases into infections caused by *C. trachomatis* from <7% to >19%. The monitoring of the outbreak confirmed a displacement of the L2b variant by L2/L2f, probably due to no symptomatic nature of L2f variant. In chapter 2 the prevalence of mixed infections caused by different invasive and non-invasive genotypes was quantified, in order to estimate the impact in the local epidemiology the co-circulation of invasive and non-invasive genotypes. We found the highest percentages described previously in industrialized countries, between invasive and non-invasive genotypes (10.9%) and worryingly high between invasive genotypes (14.6%), more related to developing countries. In the frame of this study to quantify the mixed infections, a recombinant variant between G-genotype and L2-genotype was detected in rectal samples from men who have sex with men, with few or no symptoms. This isolate was described occasionally in Seattle in 2000. In the third chapter, we study the evolution in the prevalence of recombinant variant found, increasing from 27.6% in 2010-2013 to 38, 6% during 2014 to 2015, and detected for first time in extra-rectal location and heterosexual individuals. The studies of molecular characterization and phylogenetic reconstructions were done with this recombinant variant. The results allowed identifying two clades or nodes of transmission in Madrid associated to this recombinant variant. In several clones belonging to these clades a new recombination event was observed affecting to the replacement of *ompA* gene (defining the genotype) of the G-genotype for J-genotype. This event coincided with the epidemiological shift, produced from 2014, as to the affected population (heterosexual individuals and extra-rectal location). This replacement may have contributed to a change in

cell tropism. We also have argued about the role of bridge individuals among sexual networks in the spread of new variants.

# **INTRODUCCIÓN GENERAL**





## 1. LAS INFECCIONES DE TRANSMISIÓN SEXUAL EN LA HISTORIA

El término de enfermedades venéreas fue acuñado en 1527, Bethancourt de Rouen, en honor a la diosa romana del amor. En el s.XX cambió por enfermedades de transmisión sexual (ETS) y sólo recientemente por infecciones de transmisión sexual (ITS), aceptando que muchos individuos pueden ser portadores asintomáticos de estos agentes infecciosos. A lo largo de la historia un halo de prejuicio y culpa ha envuelto a las ITS, tanto entre los individuos de una comunidad por su carácter vergonzante, como entre naciones o pueblos enfrentados usadas como *arma biológica* estigmatizante (1). En la antigüedad era una práctica habitual la acusación de unos países a otros de ser responsables de haber introducido una u otra ITS, basados más en cuestiones políticas y estrategias bélicas que en evidencias científicas. Así por ejemplo, mientras el término sífilis ya había sido descrito en 1530 por Hieronymus Fracastorius de Verona, los turcos llamaban a la sífilis la enfermedad de los cristianos, los ingleses la enfermedad francesas, los portugueses la enfermedad española y los españoles el sarampión indio (2). Para recalcar estos agravios, se popularizaban nombres que incluían el nombre de la nación objeto del escarnio, como, la viruela francesa, la peste de Bordeaux, el mal de Poitiers, el picor napolitano..., enfermedad de piel de melocotón, o las tres etapas del envenenamiento de la sangre para la sífilis (4), o el más exitoso lúes, aunque curiosamente el origen real de la sífilis permanece sin resolver, si bien la más aceptada creencia, sugiere que fuera importada desde el nuevo mundo por los españoles (3). (Ver apartado 4.4)

Históricamente, las ITS englobaban solamente gonorrea (en 1376) y sífilis (descrito en 1495), de hecho durante mucho tiempo se consideró la sífilis como una consecuencia o síntoma tardío de la gonorrea. En 1836, se incorpora a esta lista un nuevo agente, la trichomoniasis. Pero no será hasta el s XX, cuando se observe un incremento espectacular en el número de agentes infecciosos relacionados con la transmisión sexual. En 1950, se implementa el término de uretritis no gonocócica para describir una patología compleja de transmisión sexual no relacionada con gonorrea, (5). En 1970 se identifica *Chlamydia trachomatis* como el agente infeccioso más frecuentemente implicado en la uretritis no gonocócicas. En la década de 1960 se identificó a virus herpes simplex y en 1985 al virus del papiloma humano. En fechas similares se identificó el VIH (1983) y los virus hepáticos como los virus de la hepatitis B y C (1963 and 1987 respectivamente).

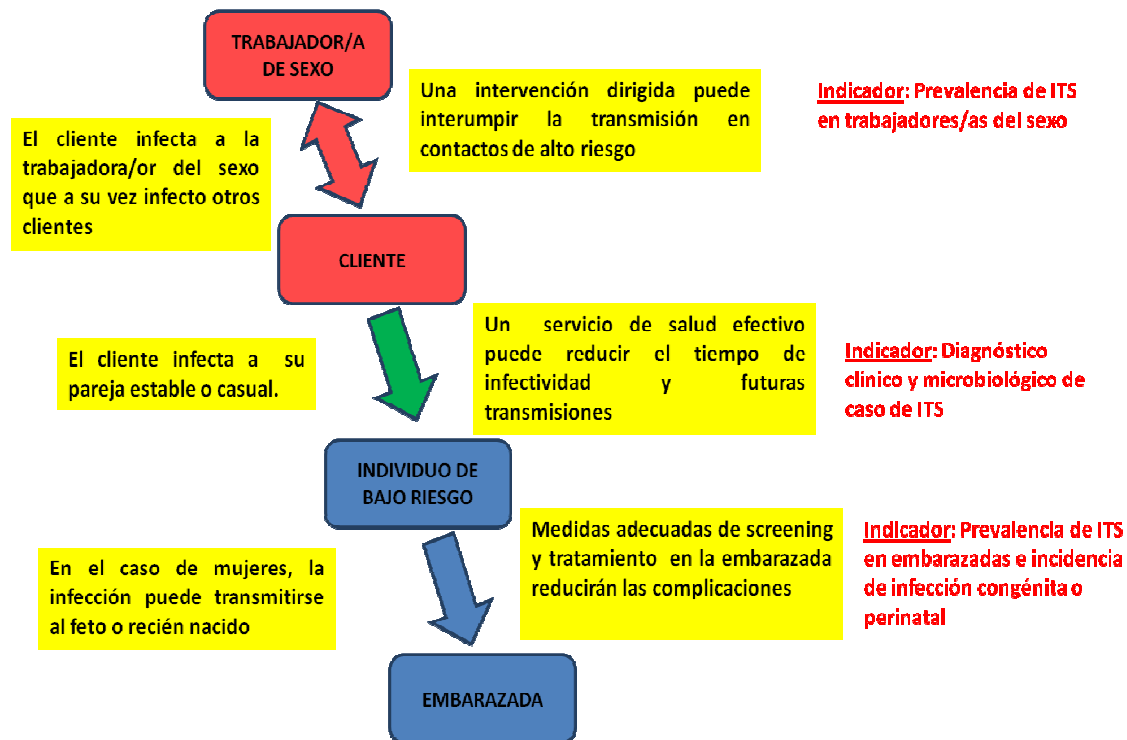
## 2. IMPORTANCIA DE LAS ITS

Las ITS están entre las enfermedades infecciosas más ampliamente distribuidas a nivel mundial, con un profundo impacto sobre la salud sexual y reproductiva de los individuos, pero también con un alto precio social por su carácter estigmatizante. Esta aurea vergonzante que ha envuelto siempre a las ITS ha contribuido a su diseminación mundial, al no instaurarse adecuadamente políticas y programas de prevención por la falta de información de datos epidemiológicos durante muchos años. Por ello, las unidades de ITS han tenido una atención a veces marginal, cuando no olvidadas. La aparición del VIH (enfermedad paradigmática entre las ITS) (6) está revirtiendo ahora en una mayor concienciación y atención de las ITS, como consecuencia de la fuerte asociación entre la transmisión de VIH y otras ITS (7, 8, 9). Una de las iniciativas actuales de la OMS es la incorporación de nuevos indicadores de ITS al programa GARPR (*Global AIDS Response Progress Reporting*) (10). Sin embargo, en la mayoría de los países no existen programas oficiales de vigilancia y notificación. Pero en aquellos lugares donde se han podido implementar adecuadamente programas de vigilancia, notificación y prevención se han observado reducciones significativas de casos. Por ejemplo en China se ha observado una reducción de un 17% de los casos de sífilis, gracias a la implantación del cribado universal que alcanza el 97,2% de la población (34). Por ello una de las principales estrategias de este programa de la OMS para 2015 consiste en establecer acciones encaminadas a la interrupción de las cadenas de transmisión (11). Globalmente las ITS constituyen no solo un grave problema de salud, también tienen un impacto económico negativo, tanto en países en vías de desarrollo, donde puede llegar a ser responsables de 17% de las pérdidas económicas (12), como en países desarrollados. El CDC estima que los cerca de 20 millones de nuevas ITS que se producen al año en EEUU, suponen 16 billones de dólares al sistema sanitario, sólo en costes directos (13).

Por otro lado surgen continuos retos para el control de las ITS que generan alertas de salud pública, como: i) Aumento de la resistencia a la azitromicina y a las cefalosporinas de amplio espectro en *Neisseria gonorrhoeae* (14, 15). Este es uno de los principales problemas de salud pública que atiende el programa Europeo de vigilancia de la resistencia antimicrobiana en gonococo (Euro-GASP) (16) ii) el incremento superior al 100% de los casos de sífilis, observado en Dinamarca, Irlanda o Noruega, entre los países europeos (17) iii) o el incremento en el número de casos de infección por *Chlamydia trachomatis*, especialmente en población adulta joven, unido a la re-emergencia de linfogranuloma venéreo (LGV) asociado a hombres que tienen sexo con hombres (18)

A nivel local, la implantación de determinados programas de prevención ha conseguido la reducción en la incidencia de determinadas ITS o sus posibles complicaciones, entre ellas destaca la implantación de la vacunación frente al VPH asociada a la reducción en la incidencia de cáncer cervical en Reino Unido (19) o el fomento del uso del preservativo en India (20). Sin embargo, pese a estos esfuerzos, los últimos informes oficiales revelan globalmente el incremento de las ITS en diferentes partes del mundo, como China. (21) o Europa (22). El informe publicado en 2012 por la OMS sobre la vigilancia epidemiológica de ITS revela como a nivel global, el número de nuevos casos al año ha aumentado de 250 millones en 1990 a 499 millones en 2008, con un aumento del 11,3% sólo entre los años 2005 y 2008 (ver apartado 4.3). Al conocimiento de este alarmante incremento, sin duda ha podido contribuir, al menos en los países industrializados, una mejora en las técnicas diagnósticas, principalmente por la implementación de técnicas moleculares, con mejores sensibilidades diagnósticas, en los laboratorios de Microbiología (23).

Este escenario de incremento global de ITS, permite reflexionar sobre nuevos planteamientos para afrontar este problema (24). Así se plantea ser más eficiente en la identificación de las llamadas “poblaciones puente” (25), en la identificación de redes sexuales (26-28) y/o seguimiento en redes sociales (29, 30). Estos nuevos planteamientos han quedado reflejados en el último informe de la OMS (31). Los usuarios o clientes de trabajadoras/es del sexo (“población puente”) tienen 10 veces más probabilidad de tener ITS (25, 32). Las enfermedades de transmisión sexual se propagan frecuentemente por redes complejas de contactos sexuales en forma de pequeños brotes, al formar frecuentemente parte de redes sexuales. Identificar y reclutar a los miembros que participan de redes sexuales reducirá las posibilidades de transmisión (33). Así, el reclutamiento de individuos a través de redes sociales por individuos recientemente diagnosticados de ITS es una buena aproximación para identificar más eficientemente posibles transmisiones secundarias. Un problema añadido para el control de la ITS viene derivado de las aplicaciones sociales en red (apps) que son cada vez más populares como sistema de encuentros sexuales entre hombres que tienen sexo con hombres. Los usuarios de estos sistemas, tienen un mayor riesgo de adquirir y transmitir una ITS que aquellos individuos que solamente encuentran parejas a través de métodos “en persona” (29, 30). Es evidente que estos nuevos hábitos deben ser estudiados y contemplados por las autoridades sanitarias locales.



**Figura 1.-** Cadena de transmisión a partir de trabajadoras/es del sexo. Posibilidad de intervenciones e indicadores para la medida de la eficacia. Adaptado de OMS.

Los argumentos presentados en estas líneas de introducción general sirven para resaltar la importancia continua y actual de las ITS, uno de los principales problemas de salud de la población mundial que afecta tanto a países en vías de desarrollo como a países desarrollados, a jóvenes, adultos o personas de edad avanzada. Si en las épocas anteriores las ITS encontraron en el prejuicio y la estigmatización sus mejores aliados para la transmisión; actualmente los cambios en las relaciones sociales y mayores niveles de liberación sexual están contribuyendo al incremento continuo de estas enfermedades infecciosas. Resulta necesario pensar en cortar esas cadenas de transmisión desde nuevos enfoques. El desarrollo de las tecnologías de biología molecular aplicada al diagnóstico, y la bioinformática aplicada a la caracterización de las dinámicas de transmisión junto con las interacciones entre grandes redes y colectivos de profesionales ayudará a este fin.

### 3. AGENTES INFECCIOSOS IMPLICADOS EN ITS.

Junto a los microorganismos clásicamente asociados a ITS como sífilis y gonococia (únicamente son transmisibles por contacto sexual); hasta cerca de 30 agentes infecciosos se han relacionado con síndromes asociados a infecciones de transmisión sexual, como VHC que frecuentemente aparecen en los listados de ITS (35). En ocasiones, la alteración de las

condiciones fisiológicas del tracto genital puede favorecer la aparición de infecciones o síndromes no adquiridos por contacto sexual, este es el caso de la candidiasis o la vaginosis bacteriana en la que la alteración de la flora vaginal produce un sobrecrecimiento de bacterias como *Gardnerella vaginalis* (36). Además la mejora, en los últimos años, de los métodos de secuenciación genómica ha contribuido tanto a incrementar la lista de agentes implicados (37) como a identificar patógenos no directamente asociados a ITS, como la posible implicación de VEB en la patogénesis de la uretritis en hombres (38), o incluso la transmisión por vía sexual del VHE (39). En otras ocasiones, microorganismos no-ITS *sensu-stricto* pueden causar infecciones asociadas a síndromes de infección sexual, sirva de ejemplo la implicación de algunos patógenos entéricos como Salmonella (40), Shigella (41) o Campylobacter (42) como posibles agentes implicados en enfermedad inflamatoria pélvica (EIP). Por lo tanto la línea, antes bien clara que definía los microorganismos asociados a ITS es cada vez más difusa. Todo esto dificulta la elaboración de un completo y exhaustivo listado de microorganismos relacionados con ITS.

Los principales agentes transmisibles por vía sexual, se muestran en la tabla 1 junto con las manifestaciones clínicas a las que se asocian ya que el abordaje clínico de las ITS se realiza desde un punto de vista sindrómico.

AGENTE	SÍNDROME CLÍNICO
<b>BACTERIAS</b>	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Uretritis no gonocócica, amnionitis, bartolinitis, cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica, endometritis, epididimitis, úlceras genitales, linfadenopatía, proctitis, conjuntivitis, neumonía en lactantes.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Uretritis, amnionitis, bartolinitis, cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica, endometritis, epididimitis, proctitis.
<i>Treponema pallidum</i>	Sífilis, úlceras genitales, linfadenopatía, afectación neurológica.
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica, endometritis, uretritis masculina
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Amnionitis, epididimitis, uretritis masculina y femenina.
<i>Haemophilus ducrey</i>	Úlceras genitales, linfadenopatía.
<i>Klebsiella granulomatis</i>	Granuloma inguinal, úlceras genitales, linfadenopatía
<b>VIRUS</b>	
VIH (VIH-1, VIH-2)	SIDA, complicaciones neurológicas, adenopatías generalizadas, infección congénita y perinatal
Herpes simplex (VHS-1 y 2)	Úlceras genitales, linfadenopatía, uretritis masculina, cervicitis, meningitis, encefalitis.
VHB	Hepatitis aguda y crónica, cirrosis, carcinoma hepático
VHC	Hepatitis aguda y crónica, cirrosis, carcinoma hepático
VPH	Verrugas anogenitales, úlceras genitales, linfadenopatía, cáncer de cérvix y anal
Molluscum contagiosum	Infección genital
<b>(ECTO)PARÁSITOS</b>	
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Vulvovaginitis, prostatitis
<i>Sarcoptes scabiei</i> (sarna)	
<i>Pthirus pubis</i>	Infestación local

**Tabla 1.** Agentes infecciosos implicados en infecciones de transmisión sexual

### 3.1. *Chlamydia trachomatis* como agente infeccioso relacionado con ITS

Las infecciones por *Chlamydia trachomatis* (CT) son la primera causa de ITS de origen bacteriano a nivel mundial. Los datos estimados sugieren más de 100 millones de personas afectadas y en más de 50 países la infección es endémica (43). Epidemiológicamente las infecciones por CT son divididas en 3 categorías o patologías infecciosas:

a) **Tracoma**, término acuñado por Dioscórides en el s.I. Importante causa de ceguera en áreas con inadecuadas condiciones de salud pública y pobre higiene personal (44). Está relacionada con infecciones repetidas en la infancia transmitida por los dedos, fómites...,

b) **Enfermedad óculo-genital no invasiva**, desde 1910 se describieron los cuerpos de inclusión en el cérvix de mujeres y en el epitelio uretral de hombres con uretritis no gonocócica (45, 46) y en 1936 se describe la capacidad de transmitirse persona a persona (47). Este tipo de infección causado por CT presenta una distribución mundial.

c) **Linfogranuloma venéreo (LGV)**, o enfermedad urogenital invasiva El término LGV fue propuesto por Schachter en 1969, para definir una entidad clínica causada por CT pero diferente a las anteriores (48). El linfogranuloma venéreo es la única infección causada por CT que produce afectación multisistémica y manifestaciones constitucionales. Esta patología es endémica en Asia, África y Sudamérica. Tanto la infección óculo-genital como LGV son de transmisión sexual, con un espectro poblacional diferente. Mientras que la infección no invasiva afecta fundamentalmente al grupo poblacional de 15-24 años y mayoritariamente femenino, la infección por LGV afecta más a hombres que tienen sexo con hombres.

Diferentes variantes de *Chlamydia trachomatis* se asocian específicamente a cada una de esas patologías. La búsqueda de nuevos biomarcadores capaces de realizar un correcto genotipado de los tres grandes patotipos ha sido objeto de reevaluación en los últimos años impulsado por la disponibilidad de información de genomas completos (ver más adelante)

#### 3.1.1. *Manifestaciones clínicas de las infecciones por C. trachomatis*

Excluimos de esta breve descripción las manifestaciones clínicas asociadas a tracoma y la infección perinatal por desviarse excesivamente del objeto de esta revisión.



### 3.1.1.1. Infecciones por genotipos urogenitales invasivos: Linfogranuloma venéreo (LGV)

LGV es una ITS causada por los serovares L1, L2 y L3 de CT. La característica biológica especial que caracteriza estos serovares de CT, es su naturaleza invasiva. Pueden afectar a las capas profundas de tejido conectivo e incluso alcanzar los ganglios linfáticos locales. Durante la primera fase, pequeñas vesículas indoloras o pápulas induradas aparecen en los órganos genitales externos entre 3-21 días después de la exposición y cura rápidamente sin dejar cicatrices. Si la transmisión es rectal la proctitis o proctocolitis es la primera manifestación. La segunda etapa que comienza 2-6 semanas después de la exposición, se caracteriza por una linfadenitis regional supurativa (59) (ya que los serotipos L1-L3 son linfotróficos) e hinchazón del tejido circulante, fiebre, escalofríos, mialgias, artralgias (en esta etapa la proctitis puede persistir). El examen histológico de los ganglios afectados muestra granulomas. En hombres heterosexuales la manifestación clínica más común es la adenopatía inguinal y/o femoral (mayoritariamente unilateral) afectando a uno o varios ganglios. Clásicamente uno de los signos más patognomónicos de la infección por LGV es el llamado signo de ranura, cuando ganglios linfáticos inguinales y femorales están afectados (15-20% de los casos) (60). La diseminación sistémica de CT está asociada a los otros síntomas como fiebre, artritis, neumonitis y más raramente perihepatitis (síndrome de Fitz-Hugh-Curtis). La mayoría de los pacientes suelen recuperarse de la segunda etapa sin secuelas, pero en algunos pacientes la persistencia o la progresiva difusión de CT en los tejidos anogenitales incitará una respuesta inflamatoria crónica, y la destrucción de tejido en las áreas involucradas, incluyendo: proctitis, proctocolitis aguda imitando la enfermedad de Chron (61), fístulas, estenosis y la desfiguración granulomatosa crónica de la vulva. Estas condiciones se presentan con mayor frecuencia entre las mujeres y hombres homosexuales, lo que refleja la implicación de ganglios linfáticos retroperitoneales (en lugar de inguinal), y la proximidad del tejido rectal y vaginal (62-64).

La infección por serotipos causantes de LGV, no es especialmente grave en sí misma, siendo fácilmente resuelta con tratamiento antibiótico adecuado. Sin embargo, en caso de infecciones no tratadas, pueden aparecer complicaciones más graves como el desarrollo de fístulas y estenosis, la elephantiasis genital y ocasionalmente el síndrome de "pelvis congelada" que puede causar infertilidad (65).

### 3.1.1.2. Infecciones por serotipos urogenitales no invasivas

#### a) *Urethritis y epididimitis*

CT es el principal agente etiológico causante de urethritis no gonocócica. El cuadro clínico se caracteriza por la presencia de descarga uretral y disuria. El espectro clínico de las infecciones causadas por serotipos urogenitales de CT es similar a las causadas por *Neisseria gonorrhoeae*. A diferencia de la urethritis gonocócica, el periodo de incubación es algo mayor, de 7 a 14 días tras el contacto de riesgo. Por otro lado la descarga uretral es menos purulenta. Se puede observar la presencia de leucocitos en la tinción de Gram en ausencia de microorganismos. Aun teniendo en cuenta estas consideraciones, no siempre es fácil diferenciar ambos cuadros. Por otro lado, hay que tener en cuenta que puede existir un alto porcentaje de infecciones asintomáticas e incluso coinfecciones entre ambos microorganismos. Una forma de presentación típica, es la urethritis postgonocócica. Este cuadro parece ser debido a una coinfección inicial por gonococo y CT. En esas situaciones la presentación más florida de la urethritis gonocócica enmascara la presencia de CT. Los individuos son tratados únicamente frente al gonococo (generalmente con un beta-lactámico como ceftriaxona), manifestando una persistencia o recurrencia de su urethritis (66). La principal complicación de la urethritis por CT en hombres, es la epididimitis, fundamentalmente en menores de 35 años. Esta complicación aparece tras una infección previa asintomática sin tratamiento (85-90% de los hombres son asintomáticos). La epididimitis por CT frecuentemente se asocia a oligospermia durante la fase aguda. Los varones con epididimitis aguda suelen presentar dolor testicular unilateral, hidrocele e hinchazón palpable del epidídimo (67).

#### b) *Cervicitis y urethritis*

La cervicitis mucopurulenta causada por CT en mujeres es el equivalente a la urethritis no gonocócica del hombre. Desde cérvix, CT puede diseminarse a uretra y vejiga dando lugar a un síndrome uretral agudo sin bacteriuria, pero también puede diseminarse hacia endometrio produciendo una endometritis. Aproximadamente el 50-70% de la mujeres con infección por CT no presentan síntomas o la sintomatología es muy leve, pero las complicaciones son más serias que en el hombre, probablemente porque CT puede persistir en estado asintomático por períodos prolongados en el tracto genital femenino. De hecho, en el 45-50% de las mujeres no tratadas, CT persiste más de un año después de la detección. Esta persistencia puede facilitar la diseminación hacia endometrio, causando endometritis, hacia trompas de Falopio causando

salpingitis o hacia el peritoneo causando peritonitis. Por difusión a través del peritoneo puede desarrollarse ascitis y perihepatitis (síndrome de Fitz-Hugh-Curtis). Esas infecciones del tracto genital femenino son colectivamente denominadas enfermedad inflamatoria pélvica y ocurre entre 10-20% de los casos de cervicitis (68). Las consecuencias a largo plazo de la enfermedad inflamatoria pélvica son dolor pélvico crónico, embarazos ectópicos, prematuridad, e infertilidad (69). La persistencia y por tanto la mayor probabilidad de desarrollar complicaciones puede estar relacionado también con el serotipo, revelando la importancia del subtipado de CT. (70).

*c) Complicaciones de las infecciones no tratadas*

Como artritis reactiva se conoce a la respuesta inflamatoria, de origen inmune, a nivel de las articulaciones, secundaria a una infección primaria de las mucosas. Se describe entre 1-5% de los pacientes con infección urogenital por *C. trachomatis*. Algunos autores han sugerido que, existe una predisposición genética del hospedador, ya que alrededor del 60-80% de los pacientes con artritis reactiva presentan el antígeno HLA-B27, el cual también se ha encontrado entre un 40-50% de casos de infección por Chlamydia (71). Clásicamente esta complicación se ha asociado a los serovares D-K, sin embargo en los últimos años se han descrito casos asociados a la infección por el genotipo L2b (72).

El termino enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) se prefiere a infección del tracto reproductivo superior (caracterizado por dolor pélvico crónico, aunque es frecuente que las mujeres remitan casos de vómitos) que puede llegar a causar disfunción en el mecanismo de transporte en el oviducto que resulta en infertilidad, o embarazos ectópicos. El dolor crónico pélvico relacionado con la presencia de adherencias peritoneales puede ocurrir en más de 15% de las mujeres con episodios previos de EIP (73). Se estima que entre un 10-40% de los casos de EIP en mujeres son secundarios a una infección por CT. Los serotipos H, I, J y K se han encontrado más a menudo en forma persistente (70).

La infección durante el embarazo puede conducir a un aborto espontáneo. Además, también se ha relacionado con ruptura prematura de membranas, parto prematuro y bajo peso al nacer. Curiosamente, las mujeres embarazadas con infección por CT tienen el doble de la tasa media de vaginosis bacteriana, lo que también se asocia con parto prematuro.

	HOMBRES	MUJERES	NEONATOS	ADOLESCENTES
<b>Síntomas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Secreción uretral purulenta</li> <li>- Disuria</li> <li>- Dolor en la micción</li> <li>- Dolor escrotal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Secreción purulenta vaginal y/o cervical</li> <li>- Sangrado</li> <li>- Disuria</li> <li>- Dolor abdominal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Conjuntivitis</li> <li>- Neumonía atípica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Secreción purulenta</li> <li>- Disuria</li> <li>- Dolor abdominal</li> <li>- Dolor y secreción rectal.</li> </ul>
<b>Cuadro clínico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uretritis</li> <li>- Proctitis</li> <li>- Faringitis</li> <li>- Proctocolitis</li> <li>- Adenopatías inguinales</li> <li>- Infección asintomática</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cervicitis</li> <li>- Uretritis</li> <li>- Faringitis</li> <li>- Proctitis</li> <li>- Infección asintomática</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Conjuntivitis</li> <li>- Ophtalmia neonatorum</li> <li>- Otitis media</li> <li>- Vulvo-vaginitis</li> <li>- Neumonía en menores de 6 meses.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uretritis</li> <li>- Vulvovaginitis</li> <li>- Proctitis</li> <li>- Faringitis</li> <li>- Conjuntivitis</li> </ul>
<b>Complicaciones</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Epididimitis</li> <li>- Orquitis</li> <li>- Conjuntivitis</li> <li>- Artritis reactiva</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- EIP</li> <li>- Perihepatitis</li> <li>- Infertilidad tubárica</li> <li>- Embarazo ectópico</li> <li>- Aborto</li> <li>- Transmisión vertical</li> <li>- Conjuntivitis de inclusión</li> <li>- Artritis reactiva</li> </ul>		

**Tabla 2.** Resumen de los distintos cuadros clínicos causados por *Chlamydia trachomatis*

#### **4. IMPLEMENTACION DE ESTRATEGIAS BIOSANITARIAS Y DISPONIBILIDAD DE NUEVAS TECNOLOGÍAS PARA FACILITAR LA PREVENCION DE LAS ITS.**

La primera línea para el control de las ITS es su prevención, principalmente instaurando campañas divulgativas y programas educativos e informativos sobre las prácticas de riesgo. Una vez transmitida una ITS, la segunda línea de actuación implica un diagnóstico rápido y el acceso a un tratamiento efectivo, de esta manera se reducirán futuras transmisiones (objetivo del programa de la OMS). La instauración de sistemas de cribado ampliamente extendidos contribuirá a identificar la infección oculta en pacientes asintomáticos, disminuyendo el riesgo de complicaciones. Por último, mejorar nuestro conocimiento sobre la epidemiología molecular y dinámicas poblacionales de estos microorganismos, basados en la aplicación de herramientas bioinformáticas, contribuirá a identificar las poblaciones vulnerables y a definir nuevas campañas de prevención. Reforzar el control de las ITS a estos tres niveles (prevención, diagnóstico y epidemiológico) ofrecerá importantes beneficios para la salud pública, contribuyendo a alcanzar los *Millennium Development Goals* (MDG), propuestos por la OMS.

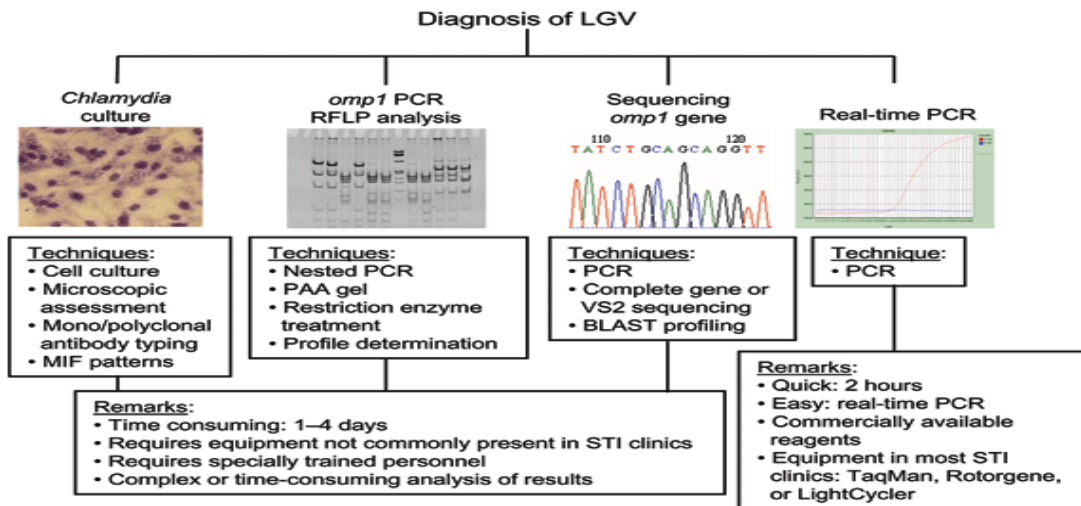
##### **4.1. Políticas de prevención**

Desde el punto de vista de la prevención, el desarrollo de vacunas, al igual que con el resto de infecciones no ITS, es el método más eficaz para reducir la incidencia y expansión de un determinado agente infeccioso. El mejor ejemplo es el desarrollo de una vacuna efectiva para prevenir el cáncer de cérvix causado por VPH (74). Algunos grupos están trabajando en el desarrollo de una vacuna frente a CT, lo que sería de gran interés dada la elevada incidencia de infecciones por esta bacteria (75, 76), y por supuesto el gran reto científico de los últimos 20 años es encontrar una vacuna frente al VIH (77)

##### **4.2. Mejoras diagnósticas**

A lo largo de la historia, se han descrito distintos métodos para la diferenciación de los serotipos asociados a LGV del resto (Figura 2). A principios de los años 70 se desarrollaron los métodos de microinmunofluorescencia, lo que permitió diferenciar a CT en distintos serovares o serotipos (49, 222). En los años 80 se desarrollaron los anticuerpos monoclonales para ensayos de fluorescencia, estableciéndose la relación entre la proteína mayor de membrana (MOMP) y los distintos serovares (50). Desde entonces, los serovares de CT están tradicionalmente asociados a la seroespecificidad de esta proteína de membrana. Los

serovares de CT se clasificaron en tres serogrupos (51). Así serogrupo B incluía a los serovares (B, D, E, L1 y L2), serogrupo C (A, C, H, I, J, K y L3) y el serogrupo intermedio (F y G). Sin embargo este sistema de asignación no correspondía con los procesos patológicos asociados con CT. El LGV está relacionado con los serotipos L1-3, tracoma con los serotipos A-C y enfermedad óculo-genital no invasiva con los serotipos D-H (52).



**Figura 2.** Esquema de los distintos métodos de caracterización de genotipos de CT.

Esta aparente discrepancia ha generado la discusión sobre la utilidad del genotipado basado en el gen *ompA* como biomarcador, para el genotipado, aunque sigue siendo ampliamente usado, debido a su alta tasa de variabilidad genética (producto muy antigénico y por tanto muy sometido a presión de selección y variabilidad) (53). El conocimiento de la secuencia de genomas completos ha permitido estudiar aquellas regiones del genoma que guardan relación con el comportamiento biológico de los distintos genotipos de CT (54). Así se ha visto, en estudios filogenéticos, como el grupo de proteínas polimórficas de membrana (PMPs) (55) son capaces de agrupar los distintos aislados en los tres principales patotipos de CT (ocular, urogenital e invasivo). También, la secuenciación de genomas completos ha permitido detectar el alto grado de conservación (sintenia) entre los genomas de las distintas especies del género *chlamydia* (56), así como desarrollar métodos de tipado molecular (57) e incluso descubrir como la recombinación juega un papel importante en la evolución de este patógeno (58), algo impensable hasta hace pocos años por tratarse de un patógeno intracelular.

#### 4.2.1. Programas de cribado

Varias líneas de evidencia sugieren que un diagnóstico temprano y la instauración rápida de tratamiento adecuado es la medida más eficaz para “romper las cadenas de transmisión” y la morbi-mortalidad asociada al diagnóstico tardío, como en el caso de VIH, VPH o CT (81). Los programas de cribado y la implementación de métodos de diagnóstico rápidos y precisos tiene especial interés atendiendo a las altas tasas de infecciones asintomáticas estimadas, relacionadas con algunas ITS como CT. En EEUU, la instauración de un programa de cribado universal de CT en hombres con bajos recursos que accedían a un programa de búsqueda de empleo, detectó una prevalencia de 8,2%, de los cuales el 70% eran asintomáticos (78). En China la ampliación del diagnóstico de sífilis en los centros de ITS, a aquellos individuos que no cumplían los criterios clínicos, demostró como casi un 41% de los pacientes con un test positivo no presentaban ningún síntoma compatible con sífilis (79). Por otro lado, la interrupción de un programa de cribado universal para la detección de CT y *Neisseria gonorrhoeae* supuso un descenso de más del 90% en el número de casos notificados (80).

El éxito de los programas de cribado y diagnóstico temprano de la ITS va directamente unido a dos variables: Garantizar la fidelización de la población a esos programas y la disponibilidad de métodos diagnósticos rápidos con adecuada sensibilidad y especificidad que eviten una segunda visita, que en muchas ocasiones no se produce. Para garantizar la fidelización algunos programas de cribado se han basado en la utilización de “auto-toma” y el envío de muestras por correo postal. En Suecia, el envío postal de muestras de orina para el diagnóstico de CT alcanzó un alto grado de aceptación, identificándose población de riesgo entre individuos jóvenes y contribuyendo a aumentar su propia percepción del riesgo (82). Comparando esta estrategia con la realización de las pruebas en un centro de ITS, los resultados fueron mucho más satisfactorios tanto para el diagnóstico inicial como para la realización de controles (83). (Una limitación a estos programas radica en la correcta toma de la muestra).

La necesaria rapidez en el diagnóstico viene determinada por el desarrollo de sistemas de “point-of-care” (POC) (84, 85) como ha ocurrido en VIH (86), sífilis (87) en comunidades remotas o con acceso difícil a los sistemas sanitarios (88, 89). Por el contrario los sistemas POC para la detección de CT han presentado tradicionalmente baja sensibilidad (15-27%)

(90). Por ello, los especialistas en ITS sugieren la necesidad de disponer de un test rápido (91) para la detección de CT con buena sensibilidad. En el caso de *N. gonorrhoeae* existen problemas de falta de especificidad por dar reacciones cruzadas con *Neisserias* saprófitas (92). Por estas razones, las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos son la prueba de referencia para el diagnóstico de las infecciones por CT y *N. gonorrhoeae* (93) pero requieren la automatización y detección de múltiples dianas en un mismo ensayo (94).

#### 4.2.2. *Sistemas moleculares de identificación de Chlamydia trachomatis*

El cultivo celular ha sido el método de referencia para el diagnóstico de infecciones por CT. La gran ventaja del cultivo celular es que presenta una especificidad cercana al 100%, si bien su sensibilidad sólo alcanza valores del 70-80% en el mejor de los casos (95). Sin embargo, los métodos de cultivo presentan grandes inconvenientes, son difíciles de estandarizar y técnicamente exigentes. Por otro lado, no permiten diferenciar unos serotipos de otros por lo que necesitan ser complementados con otras técnicas para este fin. En los últimos años se ha producido una verdadera revolución con el desarrollo de los métodos moleculares, debido a los grandes inconvenientes del cultivo (retraso diagnóstico, falta de sensibilidad, requerimientos de infraestructuras...) (95). Es por ello que en la actualidad, el cultivo celular ha quedado relegado a laboratorios de referencia, para realizar estudios fenotípicos de resistencia a antimicrobianos (96).

La estrategia molecular para aumentar la sensibilidad para la detección de CT se basa en usar como diana genes presentes en alto número de copias. En EEUU, las técnicas basadas en la captura e hibridación de los ácidos nucleicos, mediante el empleo de sondas específicas, constituye el sistema más distribuido. Tiene una alta sensibilidad al emplear como diana los miles de transcritos de 23S ARNr. En Europa, la mayoría de los sistemas comerciales se basan en la detección del plásmido críptico (~10 copias/genoma), alcanzando un límite de sensibilidad entre 300-350 copias/mL o algunas técnicas basadas en el 16S-23S ADN (2 copias/genoma). El inconveniente de esta aproximación es que el 1% de las cepas carecen de plásmido por lo que los sistemas que sólo detectan esta diana darían resultados falsos negativos en estas cepas (97). Por otra parte en 2006 se detectó en Suecia una nueva variante (nvCT) con una delección plasmídica de 377 pb en la región CDS1, correspondiendo específicamente al fragmento genómico empleado para la detección, dando como resultado falsos negativos (98). La falta de sensibilidad de los sistemas disponibles dio lugar a la diseminación de esta variante que llegó a representar el 30% de los casos en Suecia y un

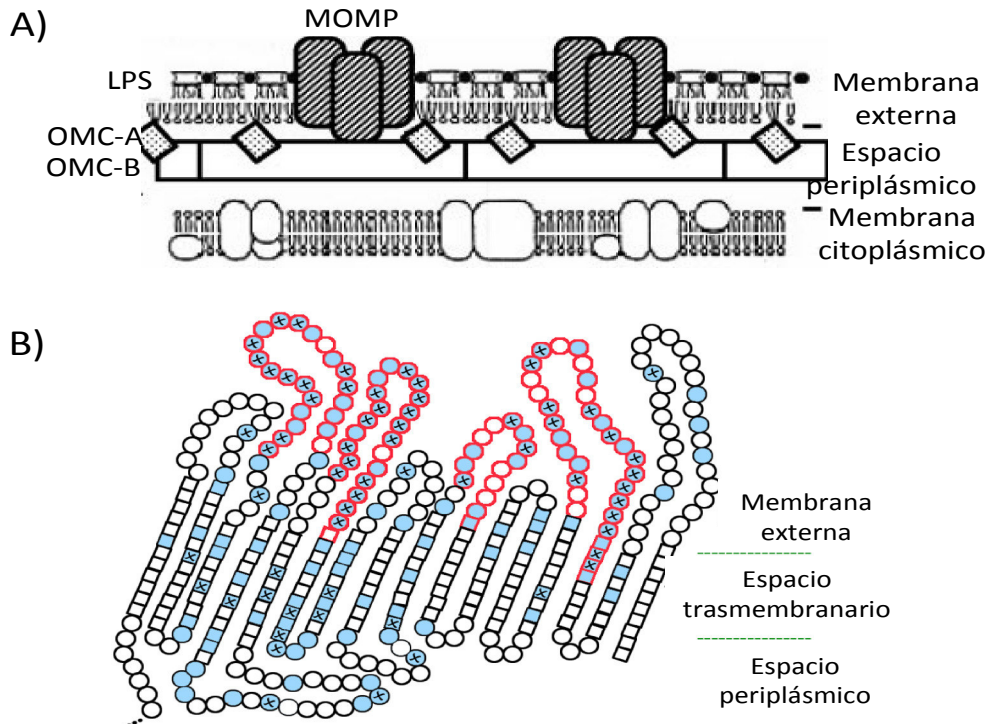


incremento significativo de los casos de CT en los años posteriores (ver apartado de brotes epidémicos por *C. trachomatis* en capítulo 1). Como consecuencia las diferentes plataformas comerciales re-diseñaron técnicas que empleaban dos dianas distintas con objeto de detectar también esta variante. Unas compañías de diagnóstico recurrieron a diseñar las 2 dianas en el mismo plásmido, mientras otras compañías apostaron como estrategia diagnóstica diseñar una diana en plásmido críptico y otra en *ompA*, que codifica para la principal proteína de membrana, en una región común a todos los genotipos de CT.

Cuando empezó el brote de linfogranuloma venéreo que inicialmente se dispersó por Europa y posteriormente por EEUU y Australia (ver capítulo 1), surgieron dos problemas relacionados con el diagnóstico molecular. Por una parte, no existían sistemas comerciales capaces de diferenciar LGV de genotipos no-LGV. Este hecho es de gran importancia ya que los individuos infectados por genotipos causantes de LGV requieren prolongar el tratamiento antibiótico con doxiciclina, durante tres semanas, mientras que en las infecciones por genotipos no-LGV se recomienda sólo una semana de tratamiento. Hoy en día se han publicado distintos ensayos caseros, basados en PCR en tiempo real (qPCR), para la diferenciación entre LGV y el resto. La aproximación más común se basa en el empleo de dianas en genes que correlacionan con patotipo (como los genes *pmp*) y postreramente técnicas de qPCR basadas en diferencias nucleotídicas en las regiones variables del gen *ompA*. Estas metodologías están siendo útiles para definir la verdadera extensión del brote de LGV. El otro inconveniente derivado del brote de LGV fue que las técnicas moleculares disponibles comercialmente, no habían sido aprobadas para su empleo con muestras de origen rectal, si bien múltiples ensayos han sido publicados a raíz del brote de LGV descrito en 2003, demostrando su utilidad (99, 100) y recientemente el CDC y ECDC han validado el empleo de muestras rectales para el diagnóstico de CT (101).

#### 4.2.2.1. Sistemas de asignación de las diferentes variantes de *Chlamydia trachomatis*

En los años 50 ya se consideraba una necesidad el disponer de ensayos capaces de diferenciar los miembros del grupo de la psitacosis-LGV (279, 280). Desde el punto de vista diagnóstico la estructura antigénica de *Chlamydia* es limitada a 2 proteínas de la membrana externa (figura 3a): la principal proteína de membrana externa (MOMP) y el lipopolisacárido (LPS), al poder ser fijadas por el complemento (281).



**Figura 3.** A) Modelo de la estructura de la envuelta de Chlamydia. Se destacan las proteínas MOMP y LPS por su papel en el diagnóstico (44). B) Representación de la estructura de MOMP. En rojo se presentan las regiones variables. Las cruces indican los cambios específicos de serovares. Las posiciones en azul, reflejan cambios encontrados en aislados clínicos que no alteran ni la función ni la respuesta inmunológica (239).

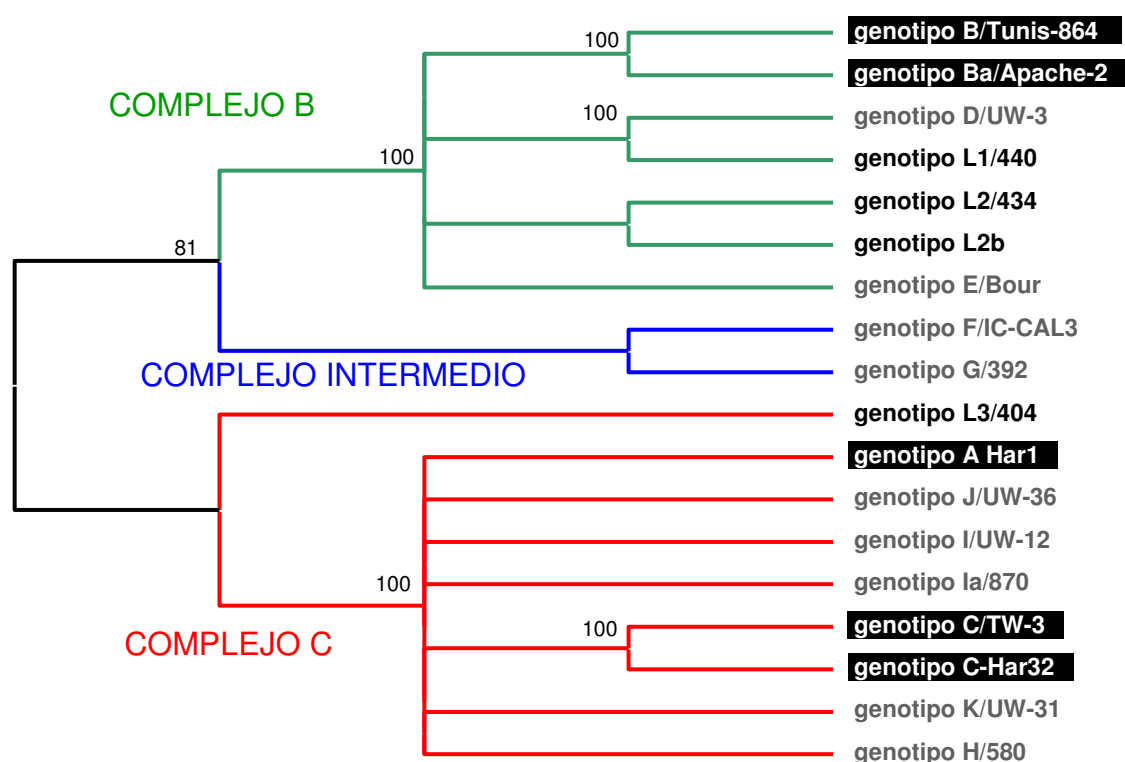
En los primeros años de la década de los 80, MOMP reveló más posibilidades diagnósticas que LPS (que progresivamente fue descartándose), ya que la existencia de pequeñas diferencias en la proteína podía generar diferente respuesta inmunológica (figura 3b), es decir el organismo humano generaba anticuerpos específicos para diferente serovares de CT (282, 283) Si bien la asignación clásica, por serovares, de las cepas de CT estaba previamente establecida por Wang y Grayston en 1970 (49) siguiendo un método de microinmunofluorescencia, aunque la razón de esas diferencias no se conocían. Las diferencias serológicas observadas estaban basadas fundamentalmente en la región variable de la proteína MOMP, codificado por el gen *ompA* (anteriormente denominado *omp1*) (224, 284). Estos hallazgos fueron confirmados por el mismo Wang y *col*, quienes mediante el empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a los diferentes epítomos de la membrana de CT (50), permitió establecer la relación entre MOMP y los distintos serotipos. Esta fue la base para identificar los distintos serovares que inicialmente se diferenciaron en dos biovars (LGV y tracoma) (biovar: grupo de cepas de una misma especie diferenciables por características fisiológicas).

Este ensayo se convirtió en el método de referencia para el tipado de aislados de CT suponiendo un gran avance en el desarrollo de métodos independientes del cultivo celular para el diagnóstico y caracterización de CT.

#### 4.2.2.1.1. El valor de MOMP

La proteína MOMP representa el 60% del peso seco de la bacteria (285), siendo el principal antígeno dominante expuesto en la membrana externa y por lo tanto altamente inmunogénico. Se han descrito varias funciones para esta proteína; en su estructura monomérica funciona como porina facilitando la permeabilidad de nutrientes y ATP (286, 287), mientras que en su estructura trimérica actúa como adhesina (288, 289) facilitando la interacción y penetración al interior de la célula. Esta propiedad de invasión en la célula humana, le confiere un papel importante en la patogenicidad y virulencia de CT, de manera similar en otras especies bacterianas gram-negativas (290). Se ha sugerido que el grado de conservación en esta proteína está directamente relacionado con el éxito ecológico de determinados serotipos (291) de forma que los serotipos más prevalentes, E y F, presentan una tasa de mutación 22 veces inferior a la del resto (239). El bajo perfil antigénico de estos serotipos podría suponer una ventaja adaptativa en la interacción con la respuesta inmune del hospedador.

La proteína consta de 5 dominios transmembranarios conservados (CD I-V) y 4 dominios variables (VD I-IV) expuestos en la superficie externa. Principalmente las diferencias antigénicas en los VD permiten la diferenciación de los distintos serovares de CT (figura 3b). Siguiendo la misma denominación establecida por los métodos serológicos frente a la proteína MOMP, la era de la secuenciación genómica ha establecido los genotipos de CT en base a las diferencias en la secuencia nucleotídica del gen *ompA* que codifica para la proteína MOMP. Sin embargo los distintos serovares o genotipos de CT basados en MOMP o *ompA* no se asocian consistentemente con tropismo tisular de los 3 principales patotipos descritos (figura 4).



**Figura 4.** Árbol filogenético de Neighbor-joining. Basado en la secuencia del gen *ompA*. Este gen puede diferenciar tres linajes (complejo B, C e intermedio) sin embargo esos linajes no corresponden a los 3 patotipos descritos en CT (LGV, Tracoma e urogenital no-invasiva). Los biovars de LGV se muestran en negro, en gris las cepas urogenitales no invasivas y en blanco sobre fondo negro los biovars de tracoma.

Una posible razón a esta paradoja es porque la variación de escape de MOMP no está unida a la variación biológica de CT. Además la presión de selección sobre el gen *ompA* facilita unas mayores tasas de recombinación en este gen (pudiendo observarse fenómenos de evolución convergente) y de mutación (lo que ha permitido conocer variantes dentro de los genotipos de referencia) que otras regiones del genoma (292). Por lo tanto en la nueva era genómica *ompA* no podrá ser empleado como marcador primario para conocer el patotipo de CT, si bien por su alta capacidad de mutación y recombinación (293), podrá ser empleado como marcador evolutivo de segundo nivel en la caracterización de brotes. En base a las diferencias nucleotídicas en *ompA*, se han desarrollado distintos métodos como RFLP (294), análisis de curvas de melting (295), métodos de hibridación (296) o incluso citometría de flujo en un array con partículas fluorescentes (297).

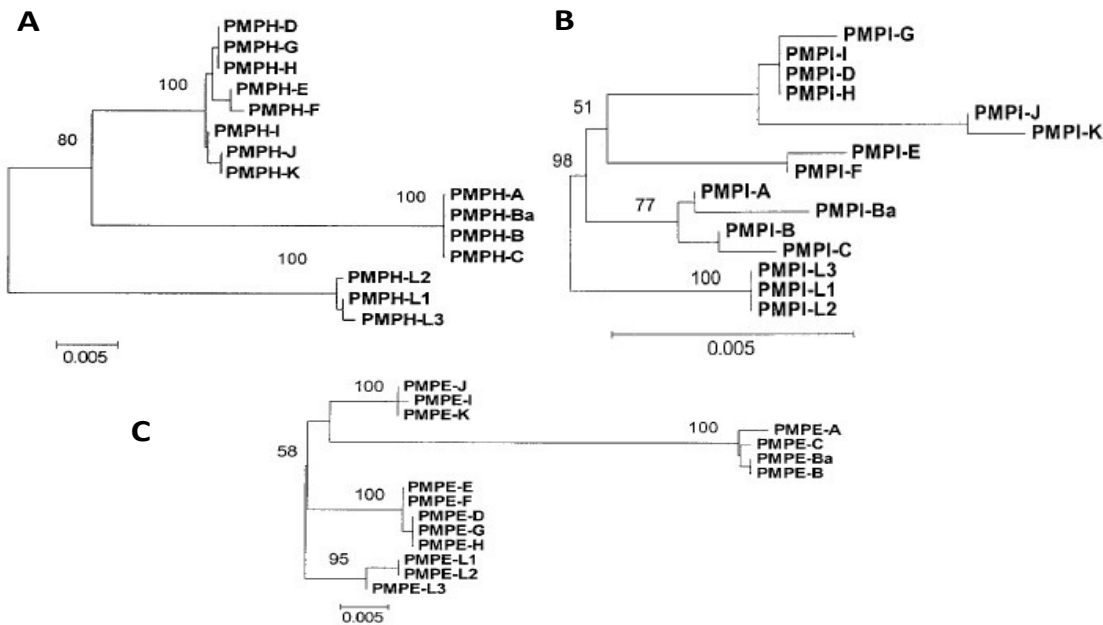


Solamente 5 fragmentos (4 genes y una región intergénica), permitieron agrupar os diferentes serotipos/genotipos conforme a su tropismo esperado (es decir en esos genes existía una gran distancia evolutiva entre cepas con diferente nicho ecológico que entre cepas que compartían un mismo nicho ecológico). Estos fragmentos fueron *pmpH*, *pmpF*, *incD*, *incE* y la región intergénica *incD/incE*. La identificación de estos genes o fragmentos sugiere que la diferenciación de los diferentes biovars (basado en el tropismo tisular) ocurrió a través de un proceso adaptativo y no por azar (como podría sugerirse de los datos de *ompA* y de la presencia/ausencia de un marcador genético). Posteriormente un nuevo gen se incluyó en esta lista, *tarP*, que codifica para un sistema de secreción tipo III (302). La proteína correspondiente muestra diferencias en el número de repeticiones en tándem entre los diferentes patotipos (303).

Probablemente los candidatos que más atención suscitaron han sido las proteínas polimórficas de membrana, Pmp, por ser un grupo de proteínas únicas de la familia *Chlamydiaceae*. Representan algo más del 3% del genoma y un 13,6% de su capacidad codificante (304), lo que refleja su papel relevante en la biología de este patógeno dada su tendencia evolutiva a la reducción del genoma.

Las PMP, en CT, son un grupo de 9 proteínas cuyos genes se agrupan en dos regiones a lo largo del genoma (figura 5), *pmpA-pmpC* y *pmpE-pmpI*, situándose sola *pmpD* (304, 305). Su localización en la membrana externa sugiere un papel en la adhesión (306, 307). También existen evidencias de su papel como proteínas autotransportadoras (308). Presentan capacidad inmunogénica al enfrentarlas a sueros de pacientes infectados (309), lo que indica un papel importante en la regulación antigénica como mecanismo de escape de la respuesta inmune del huésped.

A diferencia de *ompA*, el análisis filogenético de la mayor parte de los genes que codifican para PMPs agrupan los distintos genotipos de CT en función de sus características patogénicas y el tropismo tisular (55, 310). Diferentes grupos han trabajado, realizando estudios comparativos entre los 9 miembros de esta familia. Stothard y *col* fueron los primeros que encontraron características evolutivas interesantes en las PMPs (305). Ellos solo estudiaron *pmpE*, *pmpI* y *pmpH*, destacando este último porque tenía suficiente divergencia entre los patotipos (8%), pero pocos SNP entre los miembros de un mismo patotipo. De esta manera los análisis filogenéticos permitían con un soporte estadístico del 100% diferenciar todos los patotipos (figura 6).

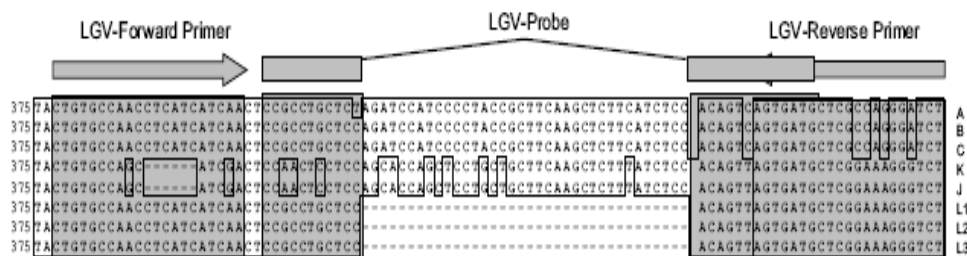


**Figura 6.** Árboles filogenéticos de NJ basados en las secuencias nucleotídicas de los genes *pmphH* (A), *pmplI* (B) y *pmpeE* (C). Solamente *pmphH* tiene suficiente soporte estadístico para separar todos los patotipos (>80). (305)

Posteriormente, Gomes y *col.* analizaron los 9 genes de la familia PMP, encontrando poca o ninguna diferenciación en *pmplA-D*, *pmplG* y *pmplI* (55). Solo *pmphH* y *pmplF* mostraba unas tasas de variabilidad altas para que el análisis filogenético tuviera soporte estadístico. De hecho *pmplF* presentó prácticamente el doble de diversidad que *pmphH*. Sin embargo esta gran diversidad en *pmplF* se ha entendido como inconveniente para encontrar secuencias conservadas para el diseño de cebadores específicos y aumentar el riesgo de falta de detección, ya que *pmphH* con mucha menos variabilidad es capaz de agrupar independientemente los genotipos más prevalente E y F (291). Además una característica importante de *pmphH* es la presencia en su secuencia nucleotídica de una delección de 36pb, característica únicamente de genotipos L, asociados a LGV. Esto ha permitido el desarrollo de distintos ensayos de PCR en tiempo real de gran impacto en el diagnóstico de estas infecciones, dada la importancia de prolongar el tratamiento en el caso de estos genotipos invasivos respecto a los no invasivos (230, 231).

Por lo tanto una estrategia actual para el genotipado de variante de CT consiste en realizar una PCR específica en el gen *pmphH* que discrimine los principales patotipos (99) y una posterior PCR y/o secuenciación del gen *ompA* para conocer la variabilidad de los miembros de un genotipo o la caracterización de un brote (311, 312).

El análisis de las secuencias nucleotídicas del gen *pmpH* permitió identificar una delección de 36pb característica únicamente de los genotipos invasivos asociados a LGV (Figura 7). Este hallazgo ha permitido el desarrollo de distintos tests caseros, basados en PCR en tiempo real (qPCR), capaces de diferenciar los genotipos LGV del resto (228-230). La implementación de esta metodología ha sido de gran utilidad tanto para la práctica clínica diaria como para definir la verdadera extensión del brote de LGV.



**Figura 7.** Diseño de PCR en tiempo real, basado en la delección de 36pb presente en el gen *pmpH*, para la detección específica de genotipos invasivos asociados a LGV.

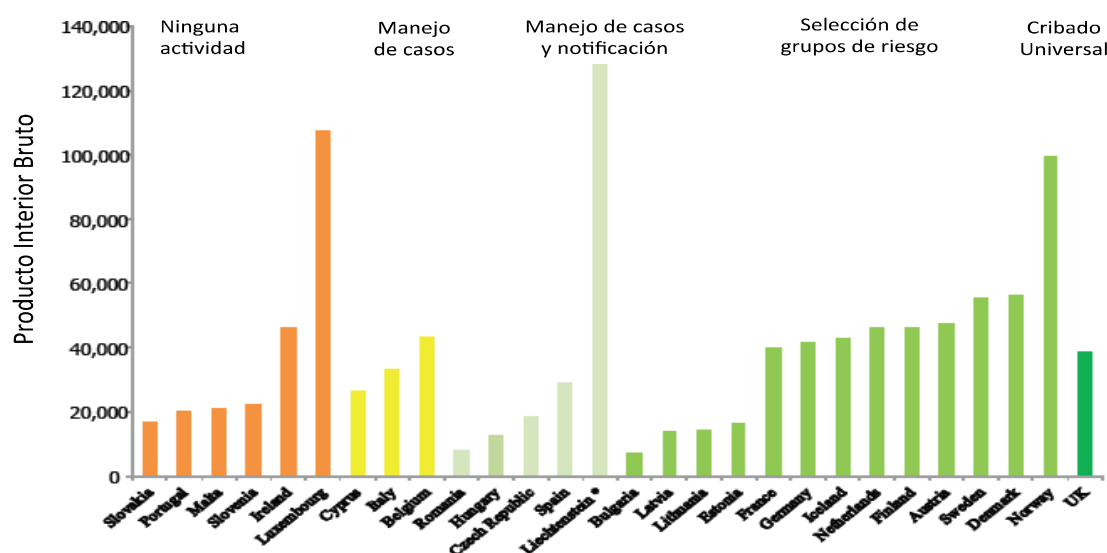
#### 4.2.2.2. Impacto de la implementación de las técnicas moleculares en el diagnóstico de las infecciones por *C. trachomatis*

La implementación generalizada de mejores técnicas diagnósticas puede revelar un incremento de la incidencia de casos en Europa. Varias líneas de evidencia soportan este argumento (en la siguiente sección de esta Tesis Doctoral se comenta el drástico incremento de los casos diagnosticados de *Chlamydia trachomatis* tanto en Europa como en USA (267, 128) desde aproximadamente 2008). Primero en 2008, el Reino Unido comenzó a incluir los datos de los programas de cribado (único país de la UE que tiene implementado este sistema) (268). Además las grandes diferencias geográficas en las tasas de incidencias están relacionadas con el nivel de vigilancia poblacional establecida (figura 8). Así por ejemplo Reino Unido, Dinamarca, Noruega o Islandia muestran las más altas cifras notificadas (>450 casos/ 100000 habitantes) en comparación con Rumania, Bulgaria o Grecia (<10 casos/ 100000 habitantes).

Progresivamente se observa un desplazamiento del número de países que no realizan ninguna actividad y se incrementan el de países que seleccionan cribado solo en grupos de riesgo incluyendo pacientes asintomáticos. Por lo que paulatinamente nos acercaremos a unas



estimaciones reales del número de infecciones por CT en Europa, subcuantificadas en la actualidad.



**Figura 8.** Distribución por nivel de implementación de la vigilancia de infecciones por *C.trachomatis* en los diferentes países de Europa. ECDC 2014

La implementación generalizada de las técnicas moleculares (tan solo 4 países de la UE realizan menos del 50% de los diagnósticos por técnica moleculares), con mayor sensibilidad y precisión sobre técnicas serológicas o de cultivo ha favorecido este incremento de el diagnóstico de infecciones por CT (269). En un estudio comparativo realizado en Francia las técnicas serológicas tenían entre un 55%-80% de sensibilidad y no eran capaces de detectar infecciones por algunos genotipos (270). La excelente sensibilidad de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para diagnóstico de infección por CT, ha llevado al CDC a recomendar muestras muy poco o nada invasivas, como una muestra vaginal mejor que endocervical en mujeres o muestra de orina en lugar de uretral en hombres (101).

Evidentemente todos estos programas de vigilancia y notificación, así como la generalización de técnicas muy sensibles y precisas, mejorará nuestra comprensión sobre las dinámicas de transmisión de CT y progresivamente los datos de incidencia reflejarán mas la realidad (Francia, Luxemburgo y Malta han planificado la instauración de programas de cribado, siguiendo el modelo de Reino Unido). Sin embargo no podemos asumir tampoco que todo el incremento sea debido a los programas de vigilancia y la generalización de técnicas

moleculares. Aunque muchos países han demostrado un incremento global en la incidencia de casos por CT en los últimos años, resulta difícil desvincular ese incremento de los argumentos anteriormente presentados. Si bien algunos ejemplos pueden encontrarse en la bibliografía. Los programas nacionales de vigilancia en Finlandia revelan un incremento en los datos de seroconversiones desde 1995 a 2003, sugiriendo que la tasa de primoinfecciones aumentaba antes de la incorporación de la implantación de técnicas moleculares (271). En Reino Unido donde el programa de cribado está implementado desde 2008 se ha observado un nuevo repunte en 2012-13 (272) o en Letonia donde el incremento es constante desde 2003 (273). Los flujos migratorios también pueden contribuir (como ha ocurrido con otras ITS o incluso con la resistencia antibiótica) a modificar la prevalencia e incidencia de esta infección, como se ha documentado en el origen del brote de LGV en Europa en 2003 o los datos presentados en esta Tesis. Un ejemplo del impacto de la inmigración se encuentra en Irlanda, uno de los países con mayor incremento de inmigrantes de la Unión Europea en el periodo 2000-2002 que mantenía unos índices de infecciones estables con anterioridad a 1999, sin embargo se observó un incremento del 85% a partir del año 2000 (274). En cualquier caso, sea como fuere, la realidad es que las infecciones por CT representan la causa más frecuentemente detectada de infección de transmisión sexual en Europa y que ahora disponemos de sencillas herramientas moleculares y bioinformáticas para conocer las tasas de infección, coinfección, persistencia y transmisión de CT.

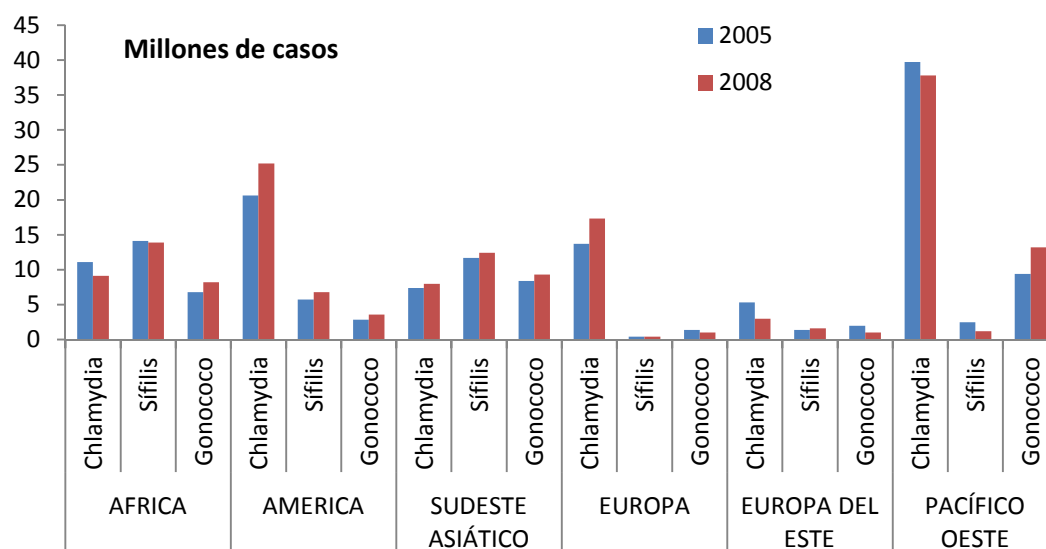
#### **4.3. Epidemiología de la ITS**

El éxito de los programas preventivos y el conocimiento de las dinámicas de transmisión requieren disponer de datos fiables, completos y abundantes que guíen una respuesta efectiva; sin embargo la vigilancia epidemiológica de las ITS ha sido muy difícil frecuentemente porque el exceso de celo ha llevado a que algunos países, especialmente del área mediterránea, como España, no dispongan de datos oficiales fiables a nivel nacional sobre la incidencia y prevalencia de las ITS. A principios del s XXI, se reconoció que la única manera de hacer una vigilancia aceptable de las ITS era asegurando la confidencialidad (113). La OMS publicó recientemente directrices actualizadas sobre la vigilancia de las ITS (114). Esta guía enfatiza, con un enfoque realista, en hacer el mejor uso de los protocolos de cribado, de las capacidades diagnósticas de los laboratorios y actualización de los comportamientos y prácticas sociales de cada área o población. Las mayores tasas de infecciones se producen en

los países en vías de desarrollo. Sin embargo el impacto de los fuertes flujos migratorios actuales desde esos países a países desarrollados (inmigración, o refugiados de guerra) (115), o viceversa (turismo, grandes movimientos religiosos, o grandes movimientos de personas como tropas militares (116,117)) facilitan la posible diseminación, selección y establecimiento en la población de nuevos y re-emergentes patógenos, o simplemente el incremento en las incidencias anuales de patógenos conocidos. Este cambio continuo en la epidemiología de las enfermedades infecciosas, como consecuencia de los flujos migratorios también es facilitado por los cambios en los patrones de prácticas sexuales, frecuentemente asociados a consumo de alcohol y drogas (118).

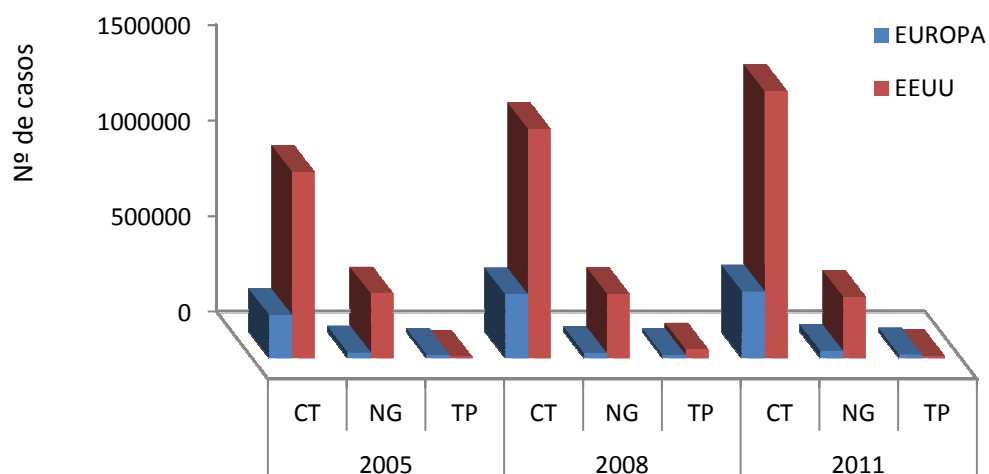
Un ejemplo paradigmático de la influencia de los flujos migratorios sobre la dispersión de agentes infecciosos, relacionados con ITS, es el VIH (119), desde la incrementada detección de subtipos no-B del VIH-1(120, 121), al incremento global de casos (122, 123) estrechamente relacionado con la inmigración. Otros ejemplos son la emergencia de linfogranuloma en Europa (124), o los casos de uretritis inespecífica no gonocócica y sífilis, después de un viaje a países en vías de desarrollo (125). Las altas cifras de sífilis reflejan el preocupante resurgimiento en determinadas regiones geográficas (126).

Según los diferentes informes de la OMS, ([www.who.int](http://www.who.int)) los datos globales de incidencia en 2008, respecto de 2005, revelan un incremento global de los principales agentes infecciosos implicados en ITS, en prácticamente todas las regiones geográficas.



**Figura 9.-** Evolución por áreas geográficas de OMS de las tres principales ITS bacterianas en el periodo 2005-2008. Datos de OMS.

Conforme al último informe de la OMS (figura 9), entre las infecciones bacterianas se observa, en el caso de las infecciones por *N. gonorrhoeae*, un incremento del 21% entre 2005 y 2008, mientras que en CT el incremento es del 4,1%. Si ahora desglosamos la evolución temporal de las grandes áreas geográficas de países desarrollados. Según el ECDC para el mismo periodo de tiempo, en Europa se notificó un incremento del 49% en las infecciones por CT (permanece como la principal causa de ITS en Europa), mientras que los casos de gonococia y sífilis disminuyeron un 12% y 10% respectivamente (127), si bien se observa un aumento de sífilis en algunas regiones como Rusia y países de Europa del Este. Según el CDC para el mismo período se observa un incremento de las infecciones por CT del 21,8%, junto con un incremento de sífilis del 36,6% (después de un descenso progresivo desde 1990 que había reducido el 89% de las infecciones por sífilis) y un descenso de 2,6% de gonococia (128). Los datos más recientes de CDC reflejan un mantenido incremento de las tasas de infección (12,0%, 7,3% y 5,2%) para los tres principales agentes bacterianos relacionados con ITS, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Treponema pallidum* respectivamente (129). En Europa el último informe del ECDC observa un incremento más discreto en el número de nuevas infecciones por CT y *N. gonorrhoeae*, pero los casos de sífilis siguen reduciéndose.



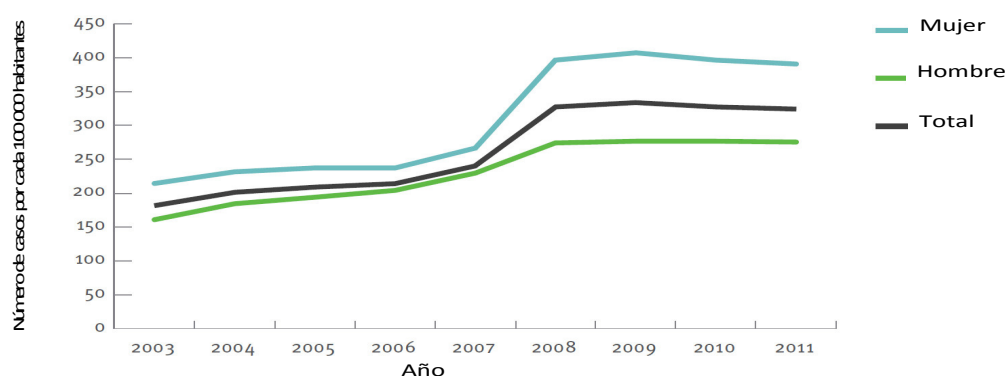
**Figura 10.-** Evolución de las tres principales ITS en Europa y EEUU entre los años 2005 y 2011. (CT, *Chlamydia trachomatis*; NG, *Neisseria gonorrhoeae* y TP, *Treponema pallidum*). Resulta destacable el incremento mantenido de los casos de infecciones por CT en EEUU en el periodo estudiado.

Sorprendentemente la tasa de infecciones por 100.000 habitantes es llamativamente más alta en EEUU que Europa para CT y *N. gonorrhoeae* (NG). Así en 2010, mientras en

Europa se estiman 186 o 10,4 los casos de infecciones por CT y NG respectivamente, en EEUU estos valores resultaron ser 426 y 100,8 casos respectivamente para los mismos microorganismos. Esta diferencia podría ser artificial y más relacionada con la implantación de programas para el registro de datos o problemas diagnósticos que verdaderas diferencias (ver apartado 4.2.2.2)

#### 4.3.1. Vigilancia epidemiológica de *C. trachomatis*

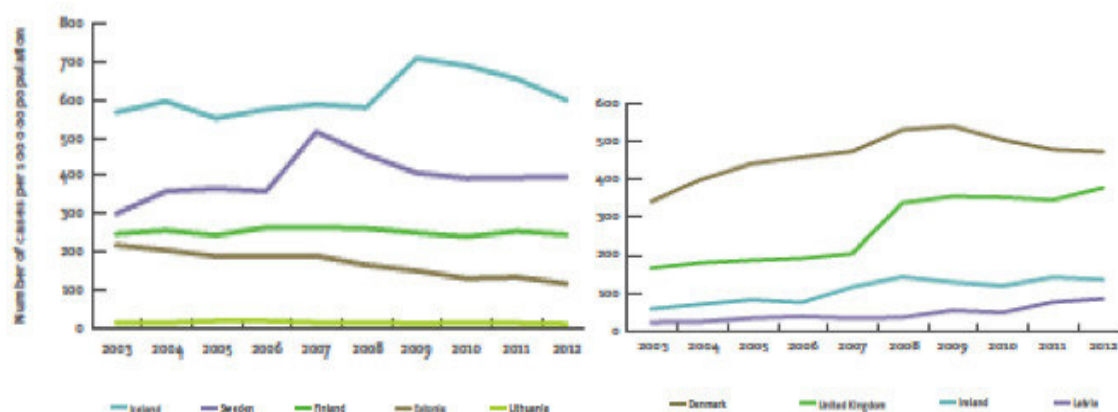
Entre todos los países, existe una unanimidad en definir los grupos poblacionales más vulnerables para sufrir infecciones por CT. Por edades: jóvenes entre 15-24 años; por sexo: femenino, aunque existen algunas excepciones como Suiza (proporción hombre-mujer es 3:1) (254), o Rumanía (13:1). Por vía de transmisión: heterosexual (la infección por vía homosexual representa <10%). Por lo tanto, el perfil del colectivo más susceptible de verse afectado por una infección por CT, no ha cambiado a lo largo de los últimos años, pese al impacto de cambios en la prácticas sexuales. Este patrón es mujer joven, sexualmente activa y heterosexual. Es en este colectivo donde han incidido los programas de vigilancia de la infección por CT; sin embargo otros grupos vulnerables deberían ser adscritos a estos programas de vigilancia por el riesgo potencial en la generación de nuevas variantes como consecuencia de una mayor promiscuidad (ver más adelante).



**Figura 11.** Casos de infecciones por CT por cada 100.000 personas en 9 países de la Unión Europea. Fuente: ECDC (Sexually transmitted infections in Europe, 2012).

Respecto a las tendencias temporales de las infecciones por CT, son variables entre diferentes áreas geográficas. Globalmente los datos más recientes a nivel europeo se presentan en la figura 11. En Europa, una interpretación sobre la tendencia global de la

infección por CT es difícil ya que resultan muy heterogéneos los sistemas de detección/diagnóstico en los diferentes países, así como en los sistemas de notificación. La variación entre unos países y otros es 2000 veces. Atendiendo a la información disponible en el ECDC, la tasa de infección por cada 100.000 personas oscila entre 175-190 casos; sin embargo analizando solamente los datos de los 9 países han aportado sistemáticamente datos desde 2003 (Dinamarca, Finlandia, Islandia, Irlanda, Suecia, Reino Unido, Lituania, Estonia y Letonia) la tasa de infección es de 344 casos/100.000 personas (figura 12). Entre estos países las tasas más altas se detectan en Islandia (media 650 casos/100.000), seguida de Dinamarca (580 casos/100.000), donde se observan sendas ligeras disminuciones.



**Figura 12.** Evolución temporal de los casos de *C. trachomatis* notificados al ECDC por los 9 países europeos que sistemáticamente han enviado datos desde 2003. Fuente: *Sexual transmitted disease in Europe 2012. ECDC 2014*

En España no existen datos oficiales, ni estimaciones poblacionales sobre la tasa de incidencia. Sin embargo si existen pequeños estudios sobre la prevalencia por grupos de edad. En diferentes parte de España se alcanza entre población joven de 15-24 años un porcentaje del 4% (255, 256). El valor más alto en población general lo encontramos en Guipúzcoa con 8% (257). En grupos vulnerables como hombres que tienen sexo con hombres alcanza el 12-15% (220). Si hacemos una inferencia con los datos del Reino Unido, único país de Europa con un programa de cribado poblacional, donde la proporción de resultados positivos es 7-9% (258), podremos estimar que España podría presentar tasas de infección similares, alrededor de 375 casos/100.000 personas.

#### 4.3.1.1. Poblaciones vulnerables

Tradicionalmente se había pensado que las infecciones por CT afectaban únicamente a las mujeres. Hoy en día sabemos que esto no es así, estas infecciones afectan por igual a

hombres y mujeres, aunque el riesgo de complicaciones, (como enfermedad inflamatoria pélvica, o infertilidad), es más frecuente en estas últimas. Algunos trabajos estiman que entre un 25-50% de los casos de enfermedad inflamatoria pélvica se asocian a infección previa por CT (259, 260), especialmente en el grupo de mujeres por debajo de 35 años (261) en las que se estima una prevalencia de casos de enfermedad inflamatoria pélvica alrededor del 10%.

La errática vigilancia de estas infecciones en la mayoría de los países desarrollados, no hace fácil identificar los grupos poblacionales mayoritariamente afectados. Los trabajos existentes identifican grupos de riesgo, pero hace difícil la extrapolación de estos datos a la población general. Algunos estudios reflejan como la prevalencia de infecciones por CT es significativamente variable en diferentes redes sociales, demostrando la irregular distribución de esta infección (262). La prevalencia varía ampliamente en función de la edad, el género, la región geográfica, los factores de riesgo e incluso la metodología diagnóstica empleada. En general, los datos oficiales reflejan un mayor impacto de estas infecciones en el grupo de edad de adolescentes y jóvenes, entre el inicio de la actividad sexual y los 30 años. En EEUU, donde las infecciones por CT son de declaración obligatoria, durante el periodo 2007-2012 se detecta una prevalencia general de 1,7% en población entre 14-39 años, llegando a 4,7% si sólo se considera el grupo de mujeres sexualmente activas entre 14-24 años y hasta un 13.5% entre mujeres de raza negra no hispanas (263). La población inmigrante, procedente de África, Asia y Sudamérica, es considerada un grupo de riesgo en el caso de infecciones por CT (264), aunque no parece constituir una población puente para la extensión de la infección entre población nativa (265).

El resurgir de LGV en los países industrializados, ha puesto de manifiesto la elevada prevalencia de infecciones por CT, no sólo de LGV, en el grupo de hombres que tienen sexo con hombres. En Holanda, donde se describió el primer caso de LGV en 2003, la prevalencia de infecciones por CT en MSM se sitúa en torno al 10%, correspondiendo un 8,7% a infecciones por genotipos asociados a LGV (210). Los factores asociados a LGV en población homosexual son mayor edad, presencia de ITS concomitantes, VIH y VHB (266). Estudios moleculares han demostrado como los patrones de transmisión son diferentes entre hetero y homosexuales, encontrándose mayor variabilidad de genotipos en el primer grupo y asociándose determinadas variantes (D, G y L2b) a los últimos (265). Estas diferencias, aunque asociadas a los distintos comportamientos sexuales en los dos grupos, también podrían reflejar la existencia de factores intrínsecos al propio microorganismo.

#### 4.3.2. Aplicación de las herramientas bioinformáticas al estudio de las ITS

La epidemiología molecular aplica conceptos de genética de poblaciones y biología evolutiva para identificar y trazar las rutas de transmisión de los microorganismos. El tipado molecular puede aplicarse al estudio de brotes y epidemias por agentes infecciosos, al estudio de la evolución y estructura de poblaciones bacterianas así como a la caracterización de la diversidad genética en un determinado ecosistema (102). El espectacular desarrollo de la epidemiología molecular en los últimos años ha sido favorecido por la enorme disponibilidad de secuencias génicas y genomas completos tanto de origen viral como bacteriano y la generalización de la secuenciación masiva. Pero también por el desarrollo de complejos software que están permitiendo responder a preguntas que antes solo quedaban para la discusión teórica-conceptual de las enfermedades infecciosas. Se describen algunos ejemplos

El análisis evolutivo de *Treponema pallidum* ha permitido arrojar luz sobre el controvertido origen de la sífilis, datando su origen en América hace entre 5.000 y 16.500 millones de años (103) y descartando las hipótesis de su posible origen hace 500 años con el mundo moderno o su coevolución con la especie humana desde el *Homo erectus*. El análisis filodinámico del VHC ha descartado su origen monofilético en distintos países europeos (104, 105) o como la prevalencia inesperada de un genotipo poco habitual en determinadas regiones geográficas puede estar relacionada con movimientos migratorios a lo largo del siglo XX (106, 107). A su vez las plataformas bioinformáticas también han permitido describir la existencia de brotes de transmisión nosocomial. La prevalencia de un único subtipo de *Treponema pallidum* en San Francisco se ha relacionado directamente con una red de contacto sexual (108). Probablemente donde más impacto han tenido estas herramientas dentro de las ITS ha sido en VIH (109). La reconstrucción de las redes de transmisión usando filogenia datada permite definir nodos o *clusters* de transmisión, identificando las poblaciones vulnerables que han permitido establecer estrategias de intervención preventiva (110). Otro ejemplo de la aplicación de estas herramientas ha sido la demostración de que la mitad de las transmisiones de VIH ocurrían en el primer año de la infección (111) y este hallazgo ha tenido importante repercusión en la implantación del tratamiento temprano de los nuevos casos diagnosticados. La secuenciación masiva ha permitido responder en VIH si la primoinfección se produce por una única o por varias variantes.



Progresivamente en la epidemiología molecular se ha evolucionado desde solamente planteamientos locales en el abordaje de un brote (absolutamente necesario), a entender, en el mundo actual, que existe una fuerte interacción entre las diferentes áreas geográficas y por lo tanto la necesidad de considerar la diversidad global para entender y describir la aparición y selección de epidemias locales. La aplicación de análisis en red (“*network programs*”) para comprender los patrones de transmisión del VIH revela el actual escenario de la dispersión de las diversas variantes del virus a nivel mundial y su impacto local (112). Además cuantas más secuencias existan depositadas en las bases de datos más preciso y mayor nivel de resolución existirá en la caracterización de las epidemias, de manera que casi de manera instantánea podamos identificar si un nuevo diagnóstico de infección por VIH pertenece o no a un agrupamiento de transmisión.

Estos son sólo algunos ejemplos de la aplicación de las herramientas bioinformáticas al estudio de las ITS. La aplicación de los conceptos de genética poblacional a las enfermedades de transmisión sexual junto con los conocimientos en epidemiología clásica, modelización y evolución permitirán un mayor entendimiento de las rutas de transmisión de estos agentes infecciosos y el análisis de los factores implicados, con el principal objetivo de ayudar a identificar aquellas medidas más efectivas para evitar su transmisión.

## **ANEXO-I: PUBLICACIÓN**





# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

## Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia* spp. y especies relacionadas

Mario Rodríguez-Domínguez<sup>a</sup>, Sara Sanbonmatsu<sup>b</sup>, Jesús Salinas<sup>c</sup>, Roberto Alonso<sup>d</sup>, José Gutiérrez<sup>b,e</sup> y Juan Carlos Galán<sup>a,f,\*</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Microbiología y CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, España

<sup>b</sup> Área de Microbiología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España

<sup>c</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus Universitario de Espinardo, Murcia, España

<sup>d</sup> Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España

<sup>e</sup> Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, España

<sup>f</sup> Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana (RYC-CSIC), Madrid, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 25 de enero de 2013

Aceptado el 31 de enero de 2013

On-line el 22 de marzo de 2013

#### Palabras clave:

Diagnóstico de *Chlamydiae*

Tipificación de *Chlamydiae*

Genomas completos

### R E S U M E N

Hasta fechas muy recientes eran muy pocos los genomas de *Chlamydia trachomatis* disponibles, a pesar de su importancia en salud pública. Actualmente se están secuenciando 66 genomas completos de *C. trachomatis*. Esta revolución genómica está permitiendo comprender su biología, mejorar la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico o desarrollar herramientas epidemiológicas no solo de *C. trachomatis* sino también de especies relacionadas, como *C. pneumoniae* o *C. psittaci*. El diagnóstico basado en cultivo celular, serología o microimmunofluorescencia está siendo progresivamente sustituido por técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, al superarse los inconvenientes de escaso rendimiento o reacciones cruzadas y mejorar la estandarización entre laboratorios. Por otra parte, el desarrollo de técnicas de tipificación (MLST y VNTR) aplicadas a *Chlamydiae* ha aumentado el conocimiento de la epidemiología local y global aportando información sobre cómo esas bacterias evolucionan, causan brotes o adquieren mecanismos de resistencia. Esta revisión se centra en los grandes avances alcanzados en el conocimiento de las diferentes especies de *Chlamydia*, en parte debido a la innovación tecnológica aplicada a la genómica como una aproximación para explicar la revolución que, tanto en el diagnóstico como en su epidemiología, se ha observado en este grupo de bacterias en los últimos años.

© 2013 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Microbiological diagnosis of infections due to *Chlamydia* spp. and related species

#### A B S T R A C T

Until recently the number of completed genomes belonging to *Chlamydia trachomatis* was very low, despite its importance in Public Health. Now, there are currently sixty-six completed genomes of *C. trachomatis* sequenced in different parts of the world. This genomic revolution has helped in understanding its biology, as well as improved the sensitivity and specificity in the diagnosis, and the development of epidemiological tools, not only for in *C. trachomatis*, but also for related species such as *C. pneumoniae* and *C. psittaci*. The diagnosis based on cell culture, serology and microimmunofluorescence is gradually being replaced by molecular techniques based on PCR or real-time PCR. This is because these molecular tests do not have cross-reactions problems and the procedures are easily standardised between laboratories. Moreover, molecular epidemiology tools described recently, such as Multi-Locus Sequence Typing (MLST) and Variable Number Tandem Repeat (VNTR), have increased our knowledge on local and global epidemiology. This article focuses on the impact of the genomics advances achieved over the last few years as applied to the diagnosis, epidemiology and biology of the family *Chlamydiaceae* family and related species.

© 2013 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

#### Keywords:

*Chlamydia* diagnosis

*Chlamydia* typing

Completed genome

\* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: jgalanm.hrc@salud.madrid.org, jgalanmontemayor@gmail.com (J.C. Galán).

# **CAPÍTULO 1**

## **CARACTERIZACIÓN DE UN BROTE DE LGV EN LA COMUNIDAD DE MADRID**



## **INTRODUCCIÓN**

### **1. TRANSMISIÓN DE LAS ITS EN FORMA DE BROTES EPIDÉMICOS**

Las enfermedades infecciosas son el ejemplo de enfermedades humanas que suelen describirse como brotes epidémicos y dentro de estas las ITS son el ejemplo paradigmático (130). Los criterios para declarar un brote por ITS son variables, pero tradicionalmente la mayoría de las ocasiones se sospechan después de la descripción de incrementos inesperados en el número de casos informados por las unidades de diagnóstico. Son buenos ejemplos el incremento de sífilis en Reino Unido o Nueva Zelanda durante 2011 (131-133), VHS-2 en Sudáfrica en 2013 (134), gonococo en Canadá (135), linfogranuloma venéreo en Europa desde 2003-actualidad (18), o las complejas epidemias basadas en la coexistencia de dos brotes epidémicos por ITS como la recientemente descrita en China por sífilis y gonococia (136). Pero en aquellos sitios con alta prevalencia, no es fácil distinguir entre fracaso del tratamiento y reinfección, como ocurre con CT. Estos ejemplos de brotes producidos por microorganismos relacionados con ITS, se diseminan a través de redes sexuales cuyas características estructurales promueven una dinámica de transmisión que muchas veces los sistemas de vigilancia no pueden o tardan en detectar (137).

Resulta difícil identificar los contactos sexuales a gran escala, por eso los servicios de epidemiología han basado sus esfuerzos en estudios a pequeña escala, usando entrevistas, trazando contactos en grupos reducidos o muestreando de manera aleatorizada (138), o en la identificación de grupos vulnerables e “individuos nodales” (139). La rápida identificación de agrupamientos tiene un efecto crítico en el control de cualquier epidemia, como demuestran los modelos de sífilis en los diferentes estados del Reino Unido (131, 132). Si los sistemas de vigilancia tardan tiempo en identificar una epidemia, aumentan las probabilidades de que se establezca y estabilice en redes y subredes locales y difícilmente podrá ser controlada (140). Esta aseveración puede resumirse en la frase: “Es más fácil manejar un problema emergente que una enfermedad endémica” (138). La respuesta sin precedentes a la pandemia del VIH puede servir como modelo para la respuesta a otros retos de la salud global.

En los últimos años las estrategias más exitosas están basadas en la combinación de las aproximaciones epidemiológicas con los análisis bioinformáticos de las secuencias genéticas de los aislamientos clínicos. De esta manera, recientemente, se han desarrollado desde sistemas de MLST (*multi-locus sequences typing*) para *T. pallidum* (141), *N. gonorrhoeae* (142) y *C. trachomatis*, a estrategias de secuenciación de genomas completos (143). Con esta

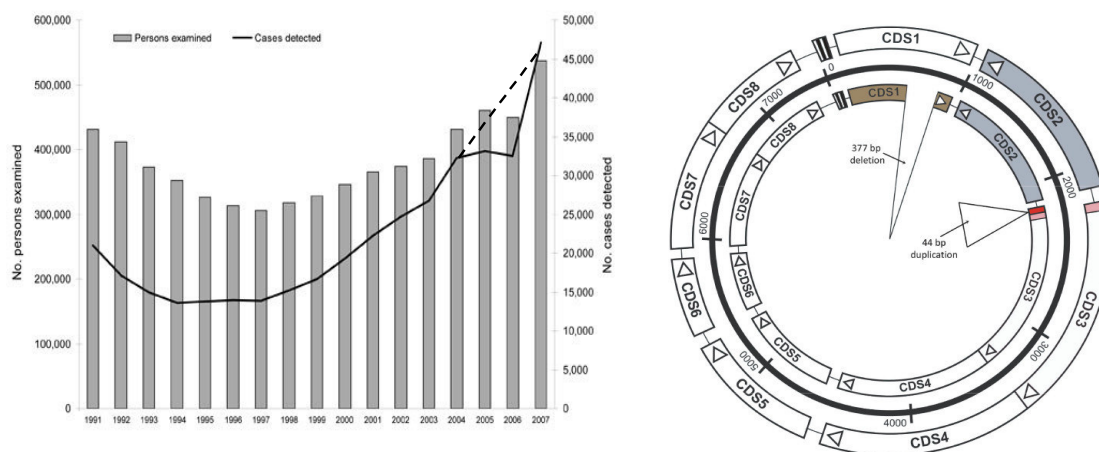
nueva aproximación en la caracterización de brotes, nuestro conocimiento sobre las dinámicas de transmisión y dispersión de agentes infecciosos en la población ha aumentado espectacularmente y se pueden obtener datos más completos, precisos y rápidos. Ejemplo de esta nueva aproximación de la epidemiología molecular aplicada a la Salud Pública pueden ser la caracterización de los casos de *N. gonorrhoeae* con resistencia a las quinolonas en Canadá (144) o susceptibilidad reducida a las cefalosporinas de amplio espectro y a la azitromicina en EEUU (145) o Europa, asociado al genogrupa G1407 (146).

## **2. BROTES EPIDEMICOS POR *C. trachomatis***

Aunque la infección genital por CT ha representado tradicionalmente la causa más común de ITS en los países desarrollados, con anterioridad a la era genómica, existían pocos casos documentados de brotes causados por CT. Al hacer una búsqueda bibliográfica resulta relativamente frecuente encontrar artículos que combinen en el título CT y epidemia, epidemia silente u oculta pero esos trabajos se refieren al incremento de la incidencia de nuevos casos, sin establecer nexos epidemiológicos entre ellos (147, 148). Sin embargo, la diferenciación de los genotipos de CT se ha revelado como una necesidad para establecer redes sexuales de transmisión o determinar casos judiciales de abusos sexuales (149). Solamente con anterioridad al año 2000 hemos encontrado un caso de transmisión familiar por CT en 1988 (150). A partir del año 2000, hay dos ejemplos paradigmáticos de la diseminación epidémica de cepas de CT. La dispersión en 2006 de la llamada variante Sueca (nvCT) y en 2003 el brote de LGV en varios países de Europa junto con casos esporádicos en EEUU (ver siguiente sección).

La nvCT es una cepa de CT descrita en Suecia, perteneciente al genotipo E que sufrió una delección de 377 bp en la región de CDS1 del plásmido críptico (151), casualmente la diana usada para el diagnóstico molecular en los sistemas comerciales de las principales empresas de diagnóstico (ver apartado 4.2.2 de introducción general). La sospecha fue generada al observarse, sin causa aparente, un descenso del 25% de los diagnósticos de infecciones por CT (152) y fue confirmada cuando las mismas muestras fueron evaluadas por otras plataformas que no usaban el plásmido críptico como diana de detección. Finalmente cuando se implantaron nuevas plataformas que permitían la detección de esta nueva variante el porcentaje de infecciones por nvCT llegó al 64% en algunas regiones de Suecia (153).





**Figura 13.** A) Incidencia de *Chlamydia trachomatis* en Suecia desde 1991 a 2007 (154). La línea discontinua marca la hipotética falta de diagnóstico que ocurrió por la dispersión de la variante nvCT. B) Plásmido de la variante sueca, nvCT, donde se muestran la delección de 377pb respecto a un plásmido críptico salvaje. (155).

La modelización matemática permitió reconstruir que la epidemia podría haberse generado 2 años antes (154). Las empresas de diagnóstico implementaron sistemas de diagnóstico basado en 2 dianas (plásmido críptico y ompA o 16S rDNA) y ha planteado el debate si la mayor garantía diagnóstica usando herramientas moleculares debe estar basada en dos dianas, como ya ocurre en VIH-1 (156).

Aunque la instauración de sistemas de detección de nvCT en Suecia ha disminuido la incidencia de esta variante (157), progresivamente se han ido documentando más países donde se ha detectado. Inicialmente los países próximos de Noruega y Dinamarca (158, 159), seguido de países centroeuropeos (160) y actualmente se ha descrito esta cepa en Rusia (161) o España (162), los dos países más distantes de Europa.

### 3. BROTE DE LGV EN EUROPA

#### 3.1. Antecedentes de los casos de LGV

Si bien la primera descripción de linfogranuloma venéreo ocurrió en 1833 por Wallace (163); El primer estudio describiendo la enfermedad apareció publicada en 1913 (164) Desde estos primeros estudios clínico-epidemiológicos se observó que afectaba mas a hombres procedentes de climas tropicales y subtropicales (165).

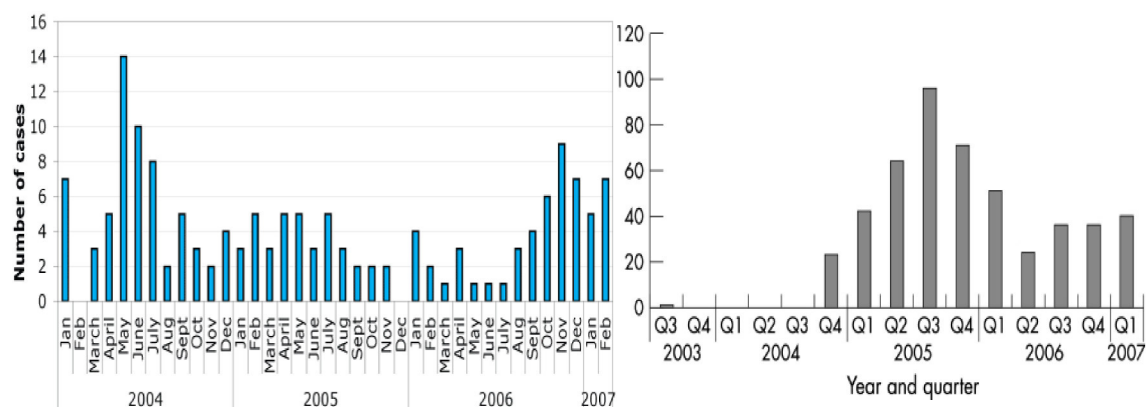
A principios del s. XXI se consideraba que si bien pueden aparecer casos esporádicos de LGV en cualquier lugar del mundo (167, 168), las altas prevalencias parecen confinadas a países

tropicales de África, Asia y Sudamérica con tasas de incidencia entre 2,5%-11%, y que la descripciones de casos en países desarrollados serán casos importados, fuertemente vinculados a los flujos migratorios. Desde la década de los años 80 se describen algunos brotes epidémicos en países industrializados afectando a HSH, causados por L1 (173). En 1989 se publica una acumulación de 27 casos de LGV en París todos ellos en pacientes no franceses, 25 de estos casos cursaron con adenopatías inguinales y solo dos de ellos con proctitis (169). También se detecta un aumento de estas infecciones en EEUU que se relaciona con la afluencia de inmigrantes de Asia y Sudamérica (170). Algunos trabajos entre 1970-1980 ya proponen la realización de cribado en donantes de sangre y mujeres embarazadas, dada la elevada prevalencia de esta infección en zonas tropicales (171). En el año 2000 se detecta un caso de LGV en un paciente homosexual en Rumanía causado por la cepa L2 (172).

### **3.2. Cambio epidemiológico: acumulación de casos de LGV en Europa.**

En el año 2003 se detectó en Holanda una acumulación de casos de proctitis aguda en HSH (174). Los análisis moleculares revelaron la presencia de una nueva variante del genotipo L2 de CT caracterizada por un cambio aminoacídico de serina por aspártico, en la posición 162 del gen *ompA* (175) a la que se denominó L2b. En los años sucesivos, se describió la presencia de esta nueva variante causando pequeños brotes en diversos países de Europa (176, 177) y más tarde y en menor medida en EEUU (178) y Australia (179).

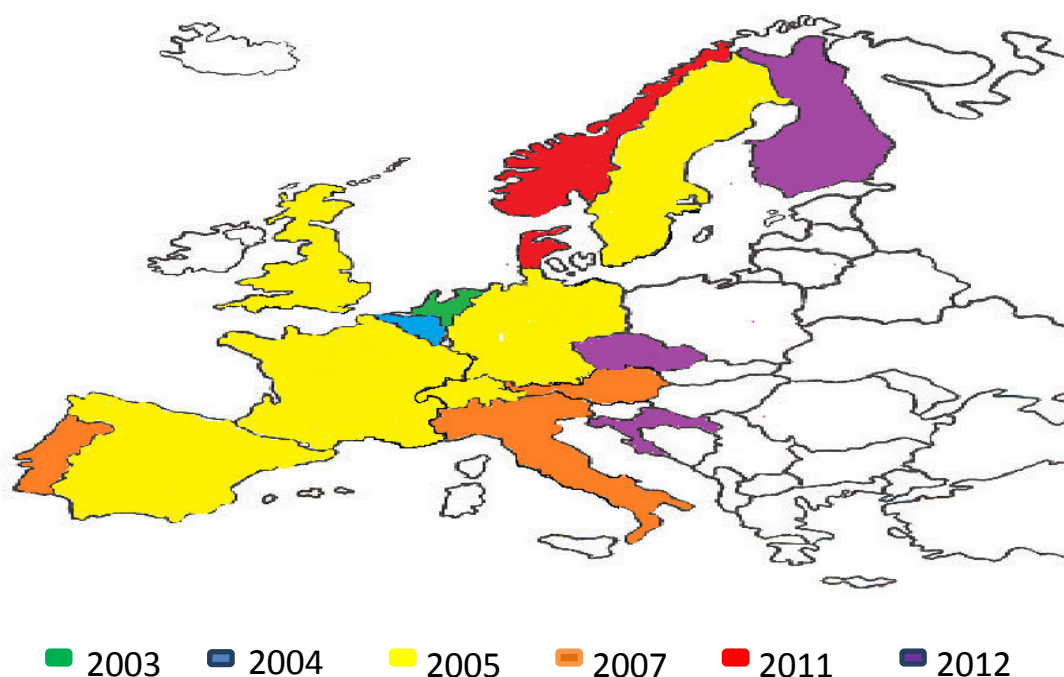
En Europa, la descripción de casos ocurrió casi radialmente desde Holanda. En 2004 en Bélgica (180), 2005 en Alemania (181), Reino Unido (182), Suiza (183), Francia (184), España (185) y Suecia (186) Como consecuencia de este acumulo de casos, algunos países como Holanda (187) y el Reino Unido (240) establecieron programas de vigilancia de la infección por CT.



**Figura 14.** Número de casos de LGV confirmados en Holanda y Reino Unido, únicos países con series temporales de LGV gracias a la disponibilidad de sistemas de notificación nacional (188, 189)

Como respuesta a este cambio epidemiológico, el ECDC impulsó la instauración de medidas de control (190) entre 18 países europeos, a través de ESSTI (18). Estos programas de vigilancia y control, detectaron una disminución en el número de casos de LGV en los años sucesivos (18) tomando como referencia aquellos países con sistemas de vigilancia instaurados (187), de forma que en 2009 algunos autores consideraban que el brote de LGV desaparecería en un futuro próximo (191). Sin embargo esta aparente resolución permitió un mayor grado de relajación y LGV progresivamente dejó de ser un problema de salud pública. En esta aparente calma poco a poco mas países europeos continuaron describiendo casos en los años sucesivos (192). Así la epidemia seguía expandiéndose por otros países europeos como Portugal (193), Italia (194) o Austria (195) en 2008. Noruega y Dinamarca en 2011 (196) y Finlandia (197), Republica Checa (192) y Croacia (198) en 2012. Finalmente en los últimos años se ha observado un repunte en el número de casos en aquellos países con sistemas de vigilancia establecidos. Tanto en el Reino Unido como en España (Barcelona) se detectó un incremento de aproximadamente el 115% en el número de casos de LGV entre 2010 y 2011 (199). Preocupantemente, en Holanda, donde se describió el brote por primera vez, el incremento detectado fue del 265% en los primeros 6 meses de 2012 (200). Una situación similar se da en EEUU ([www.bcdc.gov](http://www.bcdc.gov)) y en México ([www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx)). Recientemente se han descrito casos de linfogranuloma en Líbano (201).

Para completar la preocupante situación sobre la falta de control de este brote epidémico, los casos ya no se restringen a muestras rectales en HSH. Los recientes diagnósticos afectan a muestras faríngeas (197, 202) y mujeres (203, 204).



**Figura 15.** Evolución temporal del brote de LGV en Europa entre los primeros casos detectados en Holanda en 2003 y los últimos casos publicados en 2012.

### 3.2.1. Características clínico-epidemiológicas del brote de LGV en Europa

La presentación clásica del LGV consiste en el síndrome inguinal, caracterizado por la aparición de adenopatías inguinales y/o femorales, de localización uni o bilaterales, de aspecto inflamatorio y doloroso a la palpación, también denominados bubones. Las manifestaciones clínicas del brote descrito inicialmente en Holanda en 2003 y con posterioridad diseminado en casi todos los países de Europa, presentan algunas particularidades (205) tales como que se caracteriza por la presencia de una proctitis aguda y en algunos casos ulcerativa que puede ser confundida con patologías gastrointestinales como enfermedad inflamatoria intestinal o enfermedad de Crohn (206, 207) y ausencia de bubones. Esta nueva presentación de la enfermedad, mas relacionado con prácticas sexuales que con cambio de tropismo bacteriano, ha generado en reiteradas ocasiones retrasos diagnósticos (208), con las implicaciones de dispersión de la enfermedad entre grupos vulnerables.

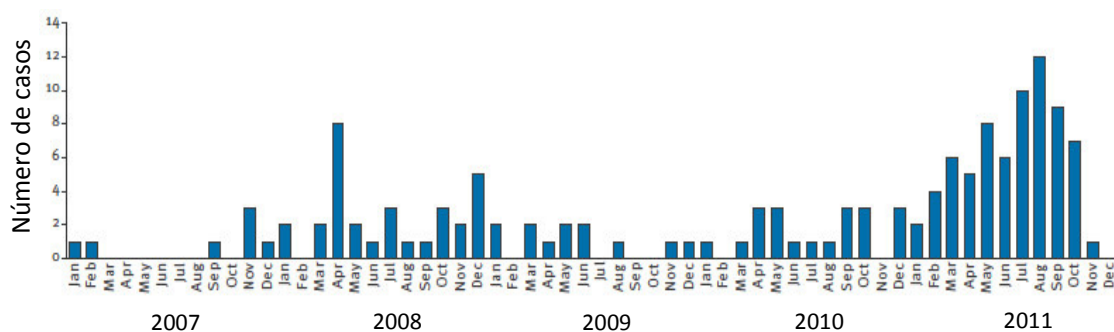
Epidemiológicamente, los casos son casi exclusivamente asociados a hombres que tienen sexo con hombres (HSH) (124), con una incidencia del 75% de coinfección con VIH y en muchas ocasiones sin recibir tratamiento antirretroviral (7) lo que implica un elevado riesgo de transmisión en población seronegativa, siendo también frecuente la presencia de otras ITS concomitantes como sífilis o hepatitis C. Como factores de riesgo se han asociado el

elevado número de parejas sexuales y el empleo de enemas y juguetes sexuales en relaciones de riesgo (18).

Comparado con el gran número de casos encontrados en muestras rectales de HSH, los casos de detección del LGV tanto uretrales como cervicales han sido residuales (204, 209). Esto podría deberse a un infradiagnóstico debido a una limitada vigilancia epidemiológica (210), ausencia de muestreo en muestras uretrales en colectivos HSH (211) o el incremento de casos asintomáticos en estas localizaciones (212) al menos en los estadios iniciales de la infección, pudiendo constituir un reservorio importante de transmisión de estos genotipos (211) y aumentar las complicaciones a largo plazo.

#### 4. DESCRIPCIÓN DE CASOS DE LGV EN ESPAÑA

En Septiembre de 2004 se diagnostica el primer caso de LGV en Barcelona (213.). Se trataba de un HSH autóctono, pareja de un caso diagnosticado en Amsterdam. El paciente portaba la variante L2b asociada al brote epidémico. Tres meses más tarde en la misma ciudad se describe un segundo caso de LGV, en HSH de origen colombiano, ahora causado por una cepa L2 (185). No será hasta Septiembre de 2007 que se describan nuevos casos de LGV, nuevamente en Barcelona, (214) pero desde este momento se identifican en la ciudad 2-3 casos/mes lo que indicaba el inicio del brote de LGV en España (215), confirmándose más tarde con el registro de 146 casos en el periodo desde 2007 a 2011, de los cuales el 49% ocurrieron en 2011(199), describiéndose también el primer caso en España de afectación inguinal y resistencia a múltiples tratamientos (216).



**Figura 16.** Casos de LGV detectados en Barcelona entre 2007 y 2011. (199)

En otras ciudades españolas no existe una datación tan precisa como en Barcelona. En Bilbao se describe en 2008 una transmisión heterosexual causado por la variante L2 (217) y un año más tarde se describe en esta misma región un caso de LGV causado por la variante L2b (218). En 2010 se detecta el primer caso de LGV en Madrid causado por la variante epidémica L2b (219). En Asturias los dos primeros casos de infección por LGV se notifican en 2013 (220). Finalmente en 2014 se detecta L2b en HSH de las islas Canarias (221).

## **OBJETIVO**

- **¿Existen casos de LGV en la CAM? De ser así, ¿Cuál es la relación con los brotes detectados en Europa en los últimos años?**
- Demostrar la circulación de cepas de CT asociadas a LGV entre población de riesgo de la CAM, estudiar la variabilidad genética y el posible origen del brote de LGV.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### *1. Periodo de estudio y centros participantes*

El periodo de estudio fue de dos años y seis meses, entre Mayo de 2009 y Noviembre de 2011. Los centros participantes fueron el Centro Sanitario Sandoval y el Hospital Universitario Ramón y Cajal, ambos en la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM).

El centro sanitario Sandoval es un centro de referencia en diagnóstico y tratamiento de las ITS en la CAM, actuando como centro centinela de estas infecciones. Ofrecen atención anónima y gratuita en toda el área sanitaria de la CAM, prestando especial atención a población de riesgo y/o con dificultades de acceso al sistema sanitario. Este centro realiza entre 20.000-30.000 consultas anuales, procesando alrededor de 20.000 muestras para análisis microbiológico, dando amplia cobertura a los patógenos más frecuentes causantes de ITS, tanto bacterianos como *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, como víricos incluido VIH, VHB, VHC y HPV.

El Hospital Ramón y Cajal es un hospital terciario de gestión pública, con cerca de 1000 camas hospitalarias, actuando como centro de referencia para una población de más de 550.000 habitantes, lo que representa más del 8% de la población madrileña. El Servicio de Microbiología trabaja en estrecho contacto con el Servicio de Enfermedades Infecciosas que a su vez cuenta con una Unidad específica de ITS.

### *2. Muestras estudiadas*

Durante el periodo de estudio se procesaron un total de 13.585 muestras para diagnóstico microbiológico de *Chlamydia trachomatis*. 12.125 de las muestras procedían del Centro Sanitario Sandoval y 1.460 procedían de la Unidad de ITS del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Ramón y Cajal. Las muestras procedían tanto de pacientes sintomáticos como asintomáticos. A todos los pacientes se les realizó un cuestionario personalizado recogiendo datos sobre prácticas sexuales de riesgo, uso de drogas, número de parejas sexuales, estado serológico de VIH y VHC así como historial previo de ITS.

En cuanto a la localización anatómica de las muestras, 3.185 correspondían a muestras de exudado rectal, 2.420 fueron exudados uretrales, 5.462 endocervicales y 2.518 exudados faríngeos. Todas las muestras fueron recogidas con torunda de Dacron e inoculadas inmediatamente en medio de transporte adecuado para clamidias (proporcionados por los



fabricantes). Aquellas muestras procesadas en un periodo de tiempo inferior a 48 horas fueron conservadas refrigeradas a 4°C, el resto se conservaron a -70°C hasta su posterior procesamiento.

### 3. *Análisis clínico epidemiológico*

De todos los pacientes se recogieron datos acerca de los signos y síntomas clínicos, así como de su estado serológico frente a VIH y virus de hepatitis. También se recopiló información sobre ITS concomitantes con la infección por CT-LGV. Se analizó la significación estadística de la asociación entre signos y síntomas con la presencia de los distintos genotipos encontrados, utilizando el método chi-cuadrado. Se consideró significativo un valor  $P < 0.05$ .

### 4. *Diagnóstico microbiológico de C. trachomatis*

El diagnóstico inicial de CT se realizó por técnicas comerciales basadas en amplificación de ácidos nucleicos. El Centro Sanitario Sandoval empleó el sistema Abbott RealTime CT/NG (Abbott Molecular Diagnostics. Des Plaines, IL. USA) mientras que el Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal empleó el sistema BD-ProbeTec<sup>TM</sup> ET CT/GC (Becton-Dickinson. Sparks, MD. USA). Ambas técnicas incluyen controles positivos y negativos para validación de los resultados.

El sistema de *Abbott RealTime CT/NG* está basado en tecnología de PCR a tiempo real. Emplea una mezcla de 4 cebadores y dos sondas que amplifican dos fragmentos genéticos diferentes en el plásmido críptico presente en CT (ver introducción general apartado 1.4.3). Este diseño permite detectar tanto la variante más común de CT, como la nueva variante descrita en Suecia, nvCT, con una delección de 377pb en el plásmido (ver introducción capítulo 1, apartado 2.2). Para la extracción del ADN se realizó en el m2000sp, un sistema automatizado basado en partículas magnéticas. En el proceso de amplificación, las sondas fluorescentes hibridan con su diana específica produciendo una señal de fluorescencia que es proporcional al número de nuevas hebras de DNA formadas. Además de los controles positivos y negativos, este sistema incorpora un control interno que añadido previamente a la lisis de las muestras permite controlar el procedimiento tanto de extracción como de amplificación y detección, dando validez a los resultados.

El sistema *BD-ProbeTec<sup>TM</sup> ET CT/GC* emplea la tecnología de amplificación por desplazamiento de hebra y posterior detección por transferencia de energía de fluorescencia,

empleando una mezcla de cebadores y una sonda que incorpora un marcador fluorescente que amplifican una región específica en el plásmido críptico. La lisis celular y extracción del material genético se realiza por calentamiento a 112-116°C durante 30 minutos. Tras la lisis, se procede a la incubación a 68-72°C con la mezcla de cebadores y sondas, posteriormente se realiza la amplificación del ADN por incubación a 51-54°C con una mezcla de enzimas de restricción y ADN polimerasa. La presencia de ADN de CT se determina por el incremento de fluorescencia por encima del punto de corte establecido por el sistema.

### 5. Detección de genotipos asociados a LGV

Las muestras con resultado positivo tanto por Abbott RealTime CT/NG o BD-ProbeTec<sup>TM</sup> ET CT/GC, en el cribado inicial de CT, se remitieron, en condiciones de refrigeración adecuadas, a la unidad de Virología Molecular del Hospital Ramón y Cajal. Estas muestras se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento. En esta unidad se realizaba un doble ensayo de PCR en tiempo real (qPCR), con el material genético de la muestra recibida. Por un lado, para descartar falsos negativos, se realizaba una qPCR usando como fragmento a amplificar una región conservada del gen *ompA* presente en todos los genotipos de CT (230). Por otro lado, se implementó un ensayo de qPCR, para la detección de todos los genotipos asociados a LGV (L1-L3), siguiendo las recomendaciones descritas por otros autores, quienes usaban la delección de 36bp del gen *pmpH* (230, 231). La cepa de referencia ATCC VR-902B que corresponde a una cepa de genotipo L2 asociado con LGV fue incluida como control positivo en cada ensayo.

En el protocolo para la detección genérica del gen *ompA* se empleó una mezcla de 3 cebadores uno directo y dos reversos (CT-F, CT-R1 y CT-R2) y una sonda (CT-PB), capaces de amplificar todos los genotipos descritos de CT, mientras que para la detección específica de los genotipos L asociados al LGV se necesitaron solamente una pareja de cebadores (LGV-F y LGV-R) y una sonda taqMan (LGV-PB) (Tabla 3).

En ambos casos, la mezcla de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 microL conteniendo 12,5 microL de 2x Taqman Fast PCR Master Mix (Applied Biosystems), una concentración final de cebadores de 150nM y 100 nM para la sonda y 5 microL del ADN extraído por cada reacción de amplificación. Las condiciones de PCR fueron idénticas en ambos casos. El protocolo consistió en 95°C/10min para la activación de la polimerasa seguido de 40 ciclos de 94°C durante 10 segundos para la desnaturalización de las hebras de ADN y 60°C durante 30 segundos para la hibridación de cebadores y sonda y posterior

elongación. La adquisición de valores de fluorescencia se realizó en el paso de elongación a 60°C.

Cebador	Gen	Posición	Secuencia (5'-3')
CT-F			GGT TTC GGC GGA GAT CCT
CT-R1	<i>ompA</i>	124-193	AGT AAC CAA CAC GCA TGC TGA T
CT-R2			AGT AAC CCA TAC GCA TGC TGA T
CT-PB			FAM-CTT GCA CCA CTT GGT GTG ACG C-TAMRA
LGV-F			CTG TGC CAA CCT CAT CAT CAA
LGV-R	<i>pmpH</i>	377-438	AGA CCC TTT CCG AGC ATC ACT
LGV-PB			FAM-CCG CCT GCT CCA ACA GTT AGT GAT G- BHQ1

**Tabla 3.** Cebadores y sondas empleados en la confirmación de la presencia de CT en la muestra clínica y detección de genotipos asociados a LGV. Adaptado de (230).

#### 6. Secuenciación de los genes *pmpH* y *ompA*

Para asegurar la correcta diferenciación entre genotipos LGV y no-LGV obtenidos por la técnica de qPCR basada en la delección de 36bp el gen *pmpH*, se seleccionaron aleatoriamente 45 muestras clínicas (18 positivas para LGV y 27 negativas), de las que se secuenció un fragmento de 404pb del gen, incluyendo la delección mencionada. Una vez identificados los genotipos asociados a LGV y confirmados que la técnica propuesta permitía discriminar con precisión esos genotipos, se secuenció un fragmento de 1124pb del gen *ompA*, para establecer las relaciones filogenéticas entre los aislados de LGV detectados en este estudio. La secuencia de los cebadores empleados figura en la Tabla 4.

Cebador	Gen	Posición	Secuencia (5'-3')
CTP1-F	<i>ompA</i>	1-1124	ATGAAAAAACTCTTGAAATCGG
CTP2-R1			ACTGTAAGTGGTATTTGTCTG
pmpH-F	<i>pmpH</i>	380-784	AAACCGTGAGTATTTCCGGA
pmpH-R			ATATGCCTCCTTCATTGTCTT

**Tabla 4.** Cebadores empleados en la secuenciación de los genes *ompA* y *pmpH*.

Para la amplificación, en ambos casos, se realizó PCR convencional empleando la polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Norwalk, EEUU) en un volumen final de 50µL conteniendo tampón de reacción (10x), Cl<sub>2</sub>Mg (1,5mM), dNTPs (0,2mM), 0,6 mM de cada primer y 1,5 unidades de enzima. Las condiciones de amplificación fueron 12 minutos de desnaturalización a 94°C seguido de 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, un minuto a 59°C y 1.5 minutos a 72°C, seguido de un paso final de elongación durante 1.5 minutos a 72°C.

La visualización de los productos amplificados se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% en el caso de *ompA* y al 1,5% en el caso de *pmpH*, preteñidos con BrEt. El producto amplificado se purificó empleando ExoSAP-IT purification kit (USB Corp., Cleveland, OH, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante, y posteriormente se secuenciaron con el sistema automático, basado en el método de Sanger, ABI Prism 377 (PE Norwalk, CONN, EEUU).

## 7. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas de los fragmentos amplificados de *ompA* y *pmpH* fueron analizadas con el software Chromas 2.33 (Technelysium Pty Ltd. Brisbane. Australia). Se realizó un posterior alineamiento y edición manual junto con secuencias de referencia obtenidas de la base de datos pública del NCBI (Nacional Center for Biotechnology) (Tabla 5) empleando el software CLUSTAL X v. 2.0 (232). Para descartar errores de secuenciación y alineamiento, las secuencias nucleotídicas fueron traducidas a proteína asegurando la ausencia de codones stop.

NOMBRE*	Número de acceso	NOMBRE	Número de acceso
L2b/39	GQ413955	L1-440	M36533
L2g-128C/07	EU676180	Ba-Apache2	AF063194
L2b-Spa/260535	JF812080	B-Har36	DQ064297
L2-CS-19/08	FJ943546	G-UW57	AF063199
L2b144276	DQ217607	F-IC-Cal3	X52080
L2bAMSTLGV	AY586530	L3-404	X55700
L2f-614C/07	EU676181	A-Har13	NC007429
L2c-US	CP002024	J-UW36	AF063202
L2-434	M14738	I-UW12	AF063200
L2a-UW396	AF304858	C-TW3	AF352789
D-UW3	AE001338	H-580	DQ064289
E-Bour	X52557	K-UW31	AF063204

**Tabla 5.-** Nombre y número de acceso de las secuencias de referencia obtenidas de la base de datos del NCBI. \*La primera letra del nombre indica el genotipo de CT.

#### 8. Selección del modelo evolutivo para el análisis filogenético

Para la selección del mejor modelo evolutivo para el análisis de nuestras secuencias se empleó el software J-Modeltest 0.1 (233), siguiendo el criterio de información de Akaike. El mejor modelo para el análisis del gen *ompA* fue el HKY (Hasegawa-Kishino-Yano) con una proporción estimada de sitios invariables. El modelo seleccionado para el análisis de *pmpH* fue el de Tamura-Nei con una tasa de variación entre posiciones siguiendo una distribución gamma.

#### 9. Análisis filogenético por el método de diagrama de redes (median joining network)

Con aquellas secuencias, pertenecientes a genotipos asociados a LGV, con idéntica secuencia del gen *pmpH*, se contruyó una red (median-joining network) empleando el software Network v4.6.1.0 (<http://www.fluxus-technology.com>), conectando cada secuencia del gen

*ompA* con su secuencia más relacionada. Este software emplea un modelo de parsimonia, considerando nodos internos como secuencias sin muestrear o genotipos ancestrales extinguidos. Esta aproximación permite simular redes de transmisión entre los aislados de LGV en las secuencias estudiadas, que están bajo fuerte selección dependiente del hospedador.

#### *10. Análisis filogenético y temporal (BEAST)*

Para la obtención de las relaciones filodinámicas en el tiempo (filodinamia datada) se empleó una estimación bayesiana que utiliza el método de cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC), implementado en el software BEAST v1.5.74. La fecha utilizada por cada secuencia fue el número de meses desde su detección, usando el modelo SRD06 de sustitución nucleotídica considerando reloj molecular estricto y relajado. El árbol generado se analizó con el software TRACER v1.5 generándose un árbol consenso con TreeAnnotator. Se aceptaron valores de convergencia mayores de 200 del tamaño muestras efectivo (ESS). El software DnaSP v5.0 (236) se empleó para calcular los valores estadísticos D (Tajima) y F (Fu and Li) para rechazar la hipótesis de que todas las mutaciones son neutras, sin selección. Para encontrar posiciones bajo selección positiva en la secuencia de proteínas se utilizó el programa MrBayes v3.

## **RESULTADOS**

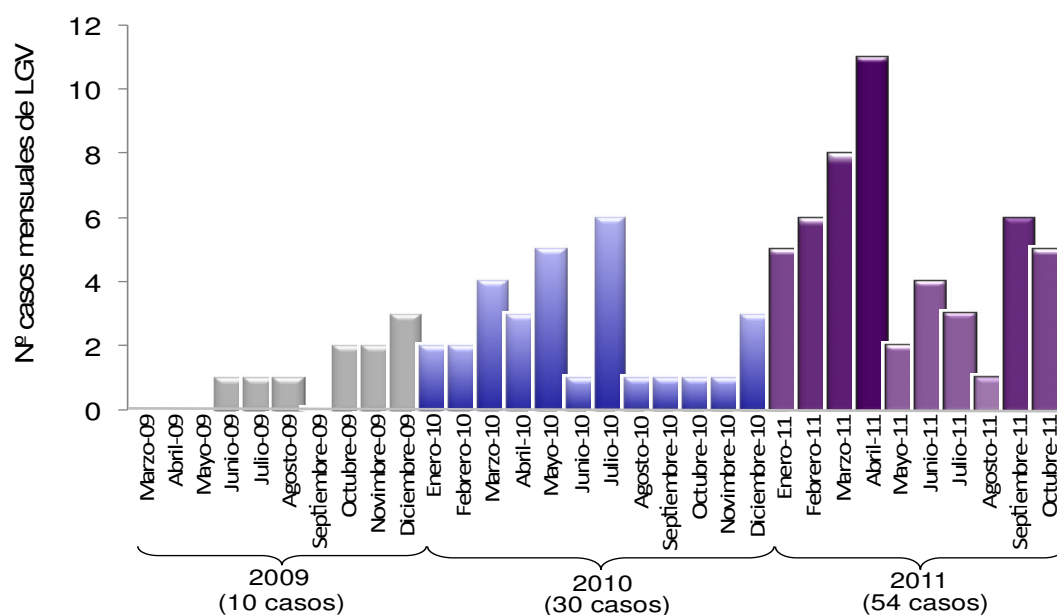
### *1. Caracterización microbiológica del brote de LGV*

Globalmente de las 13.585 muestras analizadas, en 1.239 (9.1%) se obtuvo un resultado positivo en la PCR para detección de CT. La presencia de genotipos asociados a LGV fue encontrada en 94 muestras de las 1.239 donde la presencia de CT fue detectada inicialmente, representando el 7.6% de los casos de infección por CT y un 0,7% del total de muestras analizadas. Atendiendo a la distribución por centro sanitario, en el centro Sandoval se detectó la presencia de CT en 1.114 de 12.125 muestras analizadas (representando el 9,18%), mientras que en el Hospital Ramón y Cajal se detectaron 125 infecciones por CT de 1.460 muestras analizadas (8,56%). La incidencia de infecciones por CT es similar. Por el contrario, la incidencia de infecciones por LGV si mostró grandes diferencias, mientras que 89 de 1.114 muestras procedentes del centro Sandoval fueron asignadas como LGV (8%), en el hospital Ramón y Cajal solo 5 de 125 con presencia de CT pertenecían a genotipos de LGV (4%). Lo que refleja que en ambos centros atienden a colectivos muy diferentes (grupos de riesgo mayoritariamente en el Centro Sandoval).

De acuerdo a la localización anatómica de la infección, se detectó la presencia de CT en 332 de 5.462 muestras endocervicales (representando el 6%), 419 de 3.185 muestras rectales (13,2%), en 388 de 2.420 muestras uretrales (16%) y en 100 de 2518 muestras faríngeas. En cuanto a la distribución de los casos de LGV por la localización anatómica, la mayor proporción se encontró en muestras rectales, 82 casos/419 muestras con infecciones por CT (19,2%), seguidos por 10/338 muestras uretrales (2,6%) y en menor proporción en las muestras endocervicales con solo 2/332 (0,6%) mientras que en muestras de origen faríngeo no se encontró ningún genotipo asociado a LGV. La mayoría de los casos (92,5%) fueron detectados en varones homosexuales. Los hallazgos más preocupantes fueron la fuerte asociación LGV y VIH (69/94 representando el 79,3%) y que de estos, 41 pacientes presentaban valores de carga viral superiores a 4log, lo que supone un riesgo alto de co-transmisión.

La distribución de casos de LGV incrementó de manera constante a lo largo del periodo de estudio (Figura 17). En 2009, se identificaron 10 casos, 30 casos en 2010 y 54 en 2011, lo que supone un incremento de 120% en 2009-2010 y un 80% en el periodo 2010-2011. Lo más preocupante de estos últimos datos son que los casos detectados en

heterosexuales, correspondientes a cuatro hombres y tres mujeres, fueron diagnosticados en el último periodo del estudio, año 2011.



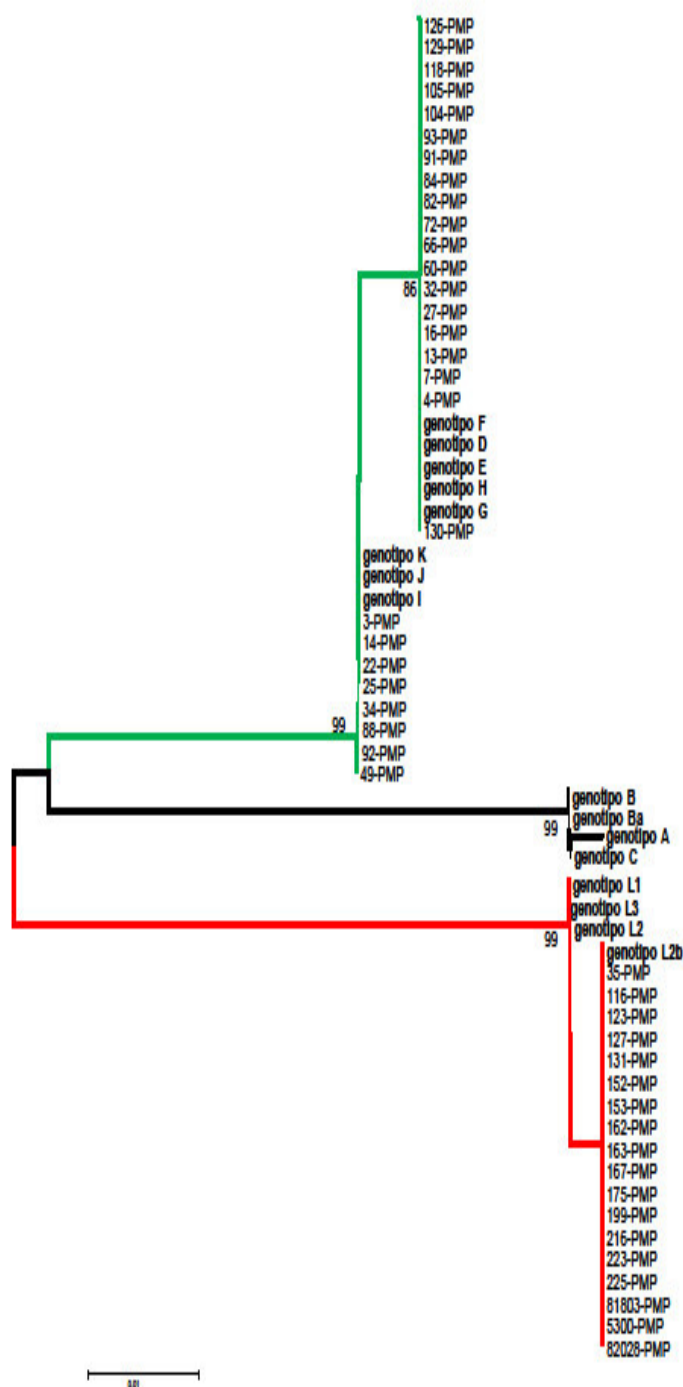
**Figura 17.** Distribución temporal de los casos de LGV a lo largo del periodo de estudio.

En relación al origen de los casos, 55,5% fueron españoles, 35,5% sudamericanos, 6% europeos y un 3% de otros países.

## 2. Validación de la PCR en tiempo real del gen *pmpH*

Las 45 muestras aleatoriamente seleccionadas entre aquellas muestras en las que se había determinado, por qPCR, la presencia de genotipos asociados a LGV basados en la delección en *pmpH*, así como de las muestras en las que se confirmó la presencia de CT, pero no pertenecientes a los genotipos asociados a LGV se obtuvo un árbol filogenético de máxima verosimilitud. De esta manera se comprobó que todas las asignaciones en genotipos LGV y no-LGV fueron correctamente realizadas (figura 18). Por lo tanto, hubo una concordancia del 100% empleando la PCR en tiempo real sobre la delección en *pmpH* como diagnóstico de los genotipos asociados a LGV. Debido a la naturaleza conservada de este gen entre los aislados de CT, no puede ser utilizado para inferir la dinámica de transmisión del brote de LGV.





**Figura 18.** Árbol filogenético obtenido por el método de neighbor-joining, con las 45 secuencias del gen *pmpH* de nuestras muestras. En negrita figuran los genotipos de referencia. La rama roja representa los genotipos asociados a LGV con las muestras que dieron resultado positivo por la qPCR de LGV, la negra los genotipos de tracoma y la verde los genotipos urogenitales no invasivos con las muestras negativas por qPCR para LGV

### *3. Incidencia de LGV en la CAM durante el periodo de estudio*

#### *3.1. Presentación clínica*

De los 94 casos positivos, 84 presentaron sintomatología desde leve o moderada (picor y diarrea) a proctitis severa (hemorragia). 10 de los casos fueron detectados en personas asintomáticas. Los signos más característicos encontrados en los casos rectales fueron edema, secreción purulenta, sangrado y presencia de ulceraciones. Un 46,8% de los casos presentaron otras infecciones concomitantes, principalmente en los casos de LGV de localización rectal. 25 de 82 casos de LGV rectal presentaron algún estadio de sífilis y 13 casos de gonorrea. Entre los casos uretrales, en cuatro casos se detectó *Neisseria gonorrhoeae* y en uno *Ureaplasma urealyticum*. (Tabla 6)

#### *3.2. Respuesta al tratamiento*

En concordancia con las guías de práctica clínica, 75 pacientes (80%) fueron tratados con un régimen de doxiciclina (100mg cada 12 horas, durante 21 días).

Dieciseis pacientes asintomáticos o sin sospecha de infección por LGV en la exploración inicial recibieron tratamiento con una sola dosis de azitromicina 1g. En estos últimos, una vez se obtuvo el diagnóstico microbiológico de LGV, se cambió al tratamiento con doxiciclina durante tres semanas. Únicamente 3 pacientes no recibieron tratamiento antibiótico al no cumplir criterios clínicos tras la exploración inicial y no acudir a consulta una vez obtenidos los resultados de microbiología. En 57 pacientes (60%) que volvieron a consulta después de finalizar el tratamiento, se realizó PCR de control post-tratamiento, confirmándose la erradicación de CT en 54 de ellos. Los tres paciente en los que la PCR post-tratamiento resultó positiva, habían sido tratados con el régimen indicado de doxiciclina y en la exploración inicial presentaban un cuadro de proctitis severa. Estos pacientes recibieron un segundo ciclo de antibioterapia con moxifloxacino, 400mg al día durante 7 días (237) tras el cual un nuevo control post-tratamiento confirmó la erradicación de cepa.

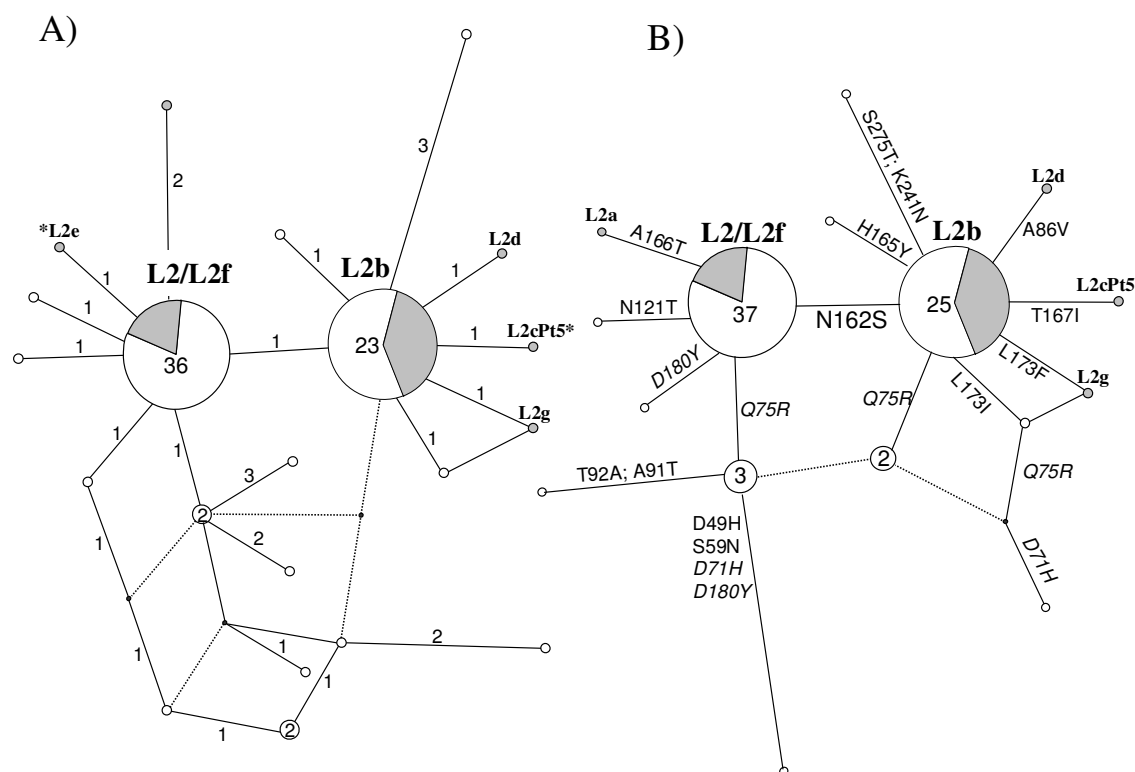
Muestra	N	CT	LGV	VIH	Otras ITS <sup>1</sup>	Clínica <sup>2</sup>	Síntomas (%)	Signos (%)
Rectal	3,185	419	82 <sup>*</sup>	66 (+1desconocido)	42	Secreción purulenta	32.9	53.6
				<sup>3</sup> (40/50 carga viral detectable)		<sup>4</sup> Dolor/tenesmo	60	
						Sangrado	43.9	23.1
						Úlcera	8.5	23.1
						Mucus	4.8	14.6
						Diarrea	7.3	
						Picor	8.5	
						Ninguno		10.9
Uretral <sup>2</sup>	2,420	388	10 <sup>#</sup>	3 (+2 desconocido)	5	<sup>5</sup> Secreción purulenta		6
				<sup>2</sup> (1/1 carga viral detectable)		Úlcera+ linfadenopatía inguinal		2
						Linfadenopatía		1
						Balanitis		1
						Ninguno		0
Cervix <sup>6</sup>	5,462	322	2 <sup>+</sup>	1 desconocido				
Faríngea	2,518	100	0					
<b>TOTAL</b>	<b>13,585</b>	<b>1,239</b>	<b>94</b>	<b>69</b>	<b>47</b>			

**Tabla 6.- Características clínicas de los 94 pacientes con diagnóstico de LGV**, en relación al tipo de muestra. <sup>(1)</sup>Las ITSs, no VIH, incluidas fueron sífilis (25 casos), gonorrea (13 casos), *C. trachomatis* non-LGV (dos casos), herpes genital (un caso) y HBV (un caso). <sup>(2)</sup>Características clínicas diferenciadas en proctitis severa o leve/moderada. <sup>(3)</sup>La carga viral no pudo ser determinada en todos los pacientes con VIH. <sup>(4)</sup>Los síntomas y signos se muestran conjuntamente. <sup>(5)</sup>Cuatro de estos pacientes presentaron uretritis gonocócica. <sup>(6)</sup>Las características clínicas no se muestran pues el número de casos LGV positivos es muy bajo. <sup>(\*)</sup> Sólo un caso se detectó en una mujer. <sup>(#)</sup> Seis pacientes eran HSH. <sup>(+)</sup>Un paciente fue asintomático.

#### *4. Caracterización epidemiológica del brote de LGV, basado en el análisis filogenético del gen ompA*

Los estudios de epidemiología molecular para la caracterización del brote de LGV en Madrid, se basaron en el estudio de la secuencia del gen *ompA*. Se obtuvo una secuencia de este gen en 75 muestras. Para evitar errores de secuenciación se trabajó con un fragmento interno de 858pb del total de la secuencia obtenida. En las 21 muestras restantes no se consiguió amplificación o ésta fue insuficiente para realizar estudios de secuenciación. En la región de 858 bp analizada las secuencias de los genotipos L2 y L2f son idénticas, por lo que al no poder discriminar entre ambos, en adelante nos referiremos a estas capas como L2/L2f.

Se realizó un análisis filogenético por el método de diagrama de redes (programa *network*) con las secuencias de *ompA* obtenidas, y usando secuencias descritas de genotipos LGV. El árbol filogenético de red obtenido, mostró la presencia de dos nodos principales de transmisión, diferenciados por una única diferencia aminoacídica (N162S). 57 de las 75 secuencias analizadas, fueron englobadas en uno de los dos nodos constituidos por las secuencias de referencia utilizadas de los genotipos L2b o L2/L2f (Figura 19). 25 secuencias se englobaron en el nodo de referencia de la variante L2b caracterizada en la gran mayoría de los brotes descritos recientemente a nivel mundial, mientras que 37 lo hicieron en el de L2/L2f (la variante L2f se describió en una mujer Portuguesa asintomática, en 2007 (238). También se identificaron 13 nuevos variantes que presentaban cambios de aminoácidos no descritos previamente, derivados de L2/L2f y L2b.



**Figura 19.** Análisis por diagrama de redes de 75 secuencias de aislados de LGV basado en *ompA*/MOMP. (A) Análisis de la secuencia nucleotídica (B) Análisis de la secuencia de proteína. \*Indica secuencias más cortas que el fragmento analizado. Los números en el interior de los círculos indican el número de secuencia incluidas en cada nodo y los números sobre las líneas el número de diferencias nucleotídica entre cada nodo. Los cambios aminoacídicos se indican en cada rama referidos a la numeración de la cepa de referencia (AM884176). Los cambios indicados en cursiva están presentes en más de una variante. Las variantes L2e y L2 no están representadas por ser idénticas en el fragmento analizado a la variante L2f. Las diferencias en el número de variantes incluidas en cada nodo entre A) y B) se corresponden con la presencia de mutaciones sinónimas. El color gris corresponde a la proporción de secuencias de referencia. Los puntos de color negro indican secuencias no obtenidas o genotipos ancestrales extinguidos. Los números de acceso de las secuencias de referencia empleadas son: L2a (AF30485); L2/(AM884176); L2b (AM884177); L2c (NC\_015744); L2d (EF460797); L2e (EF460798); L2f (EU676181); L2g (EU676180).

De acuerdo con la numeración de la cepa L2/434, se encontraron seis sustituciones no sinónimas dentro de los dominios variables de MOMP VD-I (A91T y T92A) y VD-II (N162S, H165Y, L173I y D180Y), donde se localizan los principales epítomos que participan en la neutralización así como en la respuesta a anticuerpos empleada en el serotipado (239). Adicionalmente, varias sustituciones no sinónimas se seleccionaron en más de un caso (tal como Q75R, D71H y D180Y), lo que sugiere la existencia de selección positiva o eventos de recombinación.

## 5. Diferencias en la presentación clínica de las variantes L2b y L2/L2f

Una vez identificada, por primera vez, la co-circulación de dos variantes relacionadas con el brote de LGV, se estudiaron si las grandes diferencias en la presentación clínica desde leve-moderada a grave descritas previamente podían corresponder a la infección causada por una u otra variante. La tabla 7 refleja la diferencia en los signos y síntomas observados en relación a cada variante.

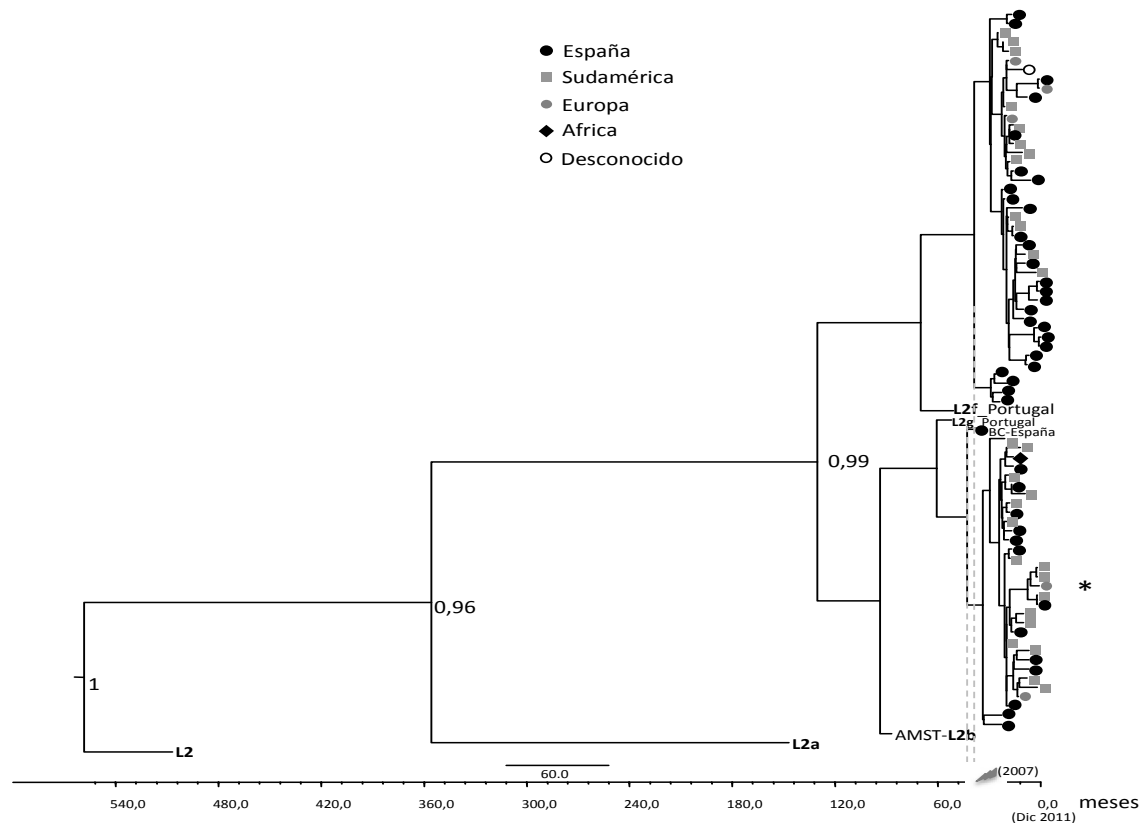
	L2b (%)	L2/L2f (%)	p
<b>SINTOMAS</b>			
Secreción purulenta	20	19.3	ns <sup>3</sup>
<b>Dolor</b>	<b>75</b>	<b>45</b>	<b>0.035</b>
<b>Hemorragia</b>	<b>70</b>	<b>32.2</b>	<b>0.008</b>
Úlcera	0	9.6	
Sin síntomas	5	12.9	ns
<b>SIGNOS</b>			
Secreción purulenta	55	58	ns
Sangrado	30	22.5	ns
Úlcera	25	22.5	ns
Adenopatías	0	9.6	
Sin signos	5	6.4	ns
<b>HIV</b>			
Positivo	80	87.1	ns
Negativo	15	12.9	ns
Desconocido	5	0	
<b>HCV</b>			
Positivo	15 <sup>2</sup>	12.9	ns
Negativo	65	64.5	ns
Desconocido	20	22.5	ns
<b>ITS concomitantes<sup>1</sup></b>			
SI	60	54.8	ns

**Tabla 7.** Características clínicas de los casos en función de la variante L2/L2f o L2b detectada. Los números en negrita indican aquellos síntomas en los que se encontraron diferencias significativas entre las dos variantes. <sup>(1)</sup> A excepción de HIV las ITSs incluidas fueron sífilis y gonorrea. <sup>(2)</sup> 8 pacientes HIV-positivos con LGV en la muestra rectal también fueron HCV positivos. <sup>(3)</sup> No significativo.

En general, los pacientes en los que se encontró la variante L2/L2f mostraron una sintomatología menos severa que aquellos en los que estaba presente la variante L2b, a excepción de la presencia de úlceras anales. Se encontró significación estadística en la asociación entre la variante L2b y la presencia de hemorragia y dolor ( $P < 0.05$ ).

## 6. Análisis de filogenia datada

Siguiendo el método bayesiano, se realizó filogenia datada, encontrando dos clados estadísticamente diferenciados ( $P>97\%$ ), correspondiendo con los nodos encontrados en el análisis de redes de transmisión (figura 20).



**Figura 20.** Árbol de filogenia datada por análisis Bayesiano. Los números en negrita indican la probabilidad estadística. El asterisco identifica un subclado o red de transmisión.

A priori, esta estimación sugiere que la variante L2b descrita en Amsterdam en 2003 (AMST-L2b) puede ser el ancestro común más reciente del clado-L2b. No se observa evidencia de la presencia de esta variante en Madrid anterior al año 2007, aunque esta variante pudo ser introducida desde el norte de España (BC-España) en los meses previos a 2007 (218). Atendiendo al origen de los pacientes, en el clado-L2b, 38.7% de los pacientes eran españoles y 45,3 de Sudamérica. Dentro de este clado, un subgrupo de 7 pacientes (\*) se diferencia significativamente ( $p>95\%$ ) pero no podemos concluir si representa un nuevo clado o nodo de transmisión.

En cuanto a las secuencias dentro del clado-L2f, podrían haber circulado en la península Ibérica desde 2006 (238) aunque no existe evidencia de su presencia en nuestra

población hasta finales del 2007. La secuencia más antigua encontrada en este clado se encontró en un paciente de Sudamérica y en dos españoles. El 50% de los casos, en este clado, se encontraron en españoles y un 28,2% en pacientes originarios de Sudamérica.

Por tanto, se demuestra la presencia de dos brotes simultáneos de LGV coexistiendo en nuestro medio, causados por dos variantes del genotipo L2/L2f y L2b. Aunque no podemos excluir si la variante L2/L2f derivó evolutivamente de L2b en nuestro entorno (L2f solo se ha descrito en la península Ibérica), aunque más bien esta representación indica dos introducciones independientes en un corto periodo de tiempo entre 2006 y 2007.



## DISCUSIÓN

La detección, genotipado y estudio de epidemiología molecular del brote de LGV en la Comunidad de Madrid se ha basado en dos etapas. Por un lado, la detección de los genotipos asociados a LGV mediante qPCR del gen *pmpH* por su buena relación entre linaje y patotipo. Por otro lado la secuenciación del gen *ompA* que codifica para la principal proteína de membrana externa, MOMP, por su alta capacidad antigénica y por tanto especialmente sensible a la acumulación de cambios. En nuestro conocimiento, este trabajo representa uno de los estudios más completos sobre la epidemiología molecular de los brotes de LGV que se están produciendo a nivel mundial en los últimos años ya que incluye cerca de 100 aislados de los que en 75 muestras se obtuvo una secuencia de 858 pb del gen *ompA*.

Los hallazgos más relevantes de este trabajo son comentados en 4 áreas: Salud pública, epidemiología molecular, filodinámica, e implicaciones clínico-terapéuticas. Desde el punto de vista de salud pública es preocupante el aumento constante, año a año, en el número de casos detectados pasando de 10 casos en 2009 a 54 casos en 2011, reflejando que el brote está lejos de ser controlado. Agrava esta situación que en el último año de este estudio se detectan los primeros casos de LGV en mujeres y hombres heterosexuales, lo que indica el inicio de la dispersión del brote a otros grupos poblacionales no descritos hasta el momento. En otros países europeos con sistemas de vigilancia activos, como Holanda (211) o Reino Unido (240) también se han reportado resultados similares. En estos países, como Alemania (241), se observa una dinámica bimodal del brote, siendo preocupante que el número de casos es mayor ahora que al comienzo del brote, aunque la razón se desconoce. Al igual que en el resto de brotes descritos a nivel mundial, donde varios autores han descrito la fuerte asociación entre infección por LGV y VIH (7), en el brote epidémico por LGV en Madrid el 73,4% de los pacientes (69/94) presentaron serología positiva a VIH. Pero, alarmantemente en este trabajo se describe por primera vez que 51/69 pacientes coinfectados VIH-LGV (80%) tenían carga viral >4log. De hecho en 4 pacientes el diagnóstico de LGV coincidió con primoinfección por VIH. Esta situación refleja el elevado riesgo de co-transmisión entre el LGV y el VIH, revelando nuevamente el grave problema de salud pública que es el brote de LGV en Madrid.

Desde el punto de vista de epidemiología molecular, el hallazgo más destacable ha sido la identificación por primera vez de la co-circulación de 2 genovariantes, L2b y L2/L2f. Los brotes epidémicos descritos desde 2003 indicaban que todos los casos eran causados por

la cepa L2b (54, 242-245), lo que sugería una dispersión de la misma cepa desde el caso índice en Holanda (246). Sin embargo nuestro trabajo revela dos nodos de transmisión debido a dos variantes diferentes de LGV. Uno de estos nodos, está constituido por 25 secuencias idénticas a la secuencia de la variante L2b descrita en Holanda. Otras 5 variantes de L2b con 1-3 cambios aminoacídicos no descritos previamente, fueron también encontradas. Recientemente la variante L2b con el cambio L173F (conocida como L2g y descrita en la península Ibérica) o con el cambio L173I han sido descritas en EEUU (247). El segundo nodo, constituido por 37 secuencias, corresponde a la variante L2/L2f descrita en los años 70 en EEUU y en Portugal en 2009 (238). Seis variantes derivadas del genotipo L2/L2f, con 1-4 cambios aminoacídicos tampoco han sido descritos hasta el momento. Esta situación epidemiológica presenta un escenario no descrito previamente en ninguno de los recientes brotes descritos a nivel mundial. Sary y col (195) y Gomes y col (238), en su descripción de los brotes de LGV en Austria y Portugal, respectivamente, describen la presencia de variantes respecto a la cepa de referencia L2b, pero se trata de casos aislados, siendo el mayor porcentaje de casos encontrados en estos países debido a la nueva variante L2b. En EEUU durante 2014 (247), han descrito la co-circulación de L2b y mayoritariamente L2b-L173I, sugiriendo que a medida que el brote epidémico por LGV se prolonga en el tiempo se observarán procesos de diversificación (248). Por otra parte, la selección de genovariantes con cambios en la misma posición (cambios en la leucina-173), así como la selección del mismo cambio en varias ocasiones (D71H, Q75R o D180Y), como revela la figura 12 y que 13/16 cambios nucleotídicos detectados correspondan a sustituciones no-sinónimas, sugieren que MOMP está bajo selección positiva (58), apoyado por los datos observados en EEUU donde la variante L2b con el cambio L173I esta desplazando a la variante L2b. Siete de esos cambios aminoacídicos (A91T and T92A, N162S, A166T, T167I, L173I y D180Y, corresponden a los dominios variables (VD), donde están localizados los determinantes antigénicos y probablemente representa mutantes de escape a la neutralización por el sistema inmune (239).

Desde el punto de vista de la filodinamia, la coexistencia de 2 genovariantes permite sugerir diferentes dinámicas de transmisión. La variante L2/L2f se encontró principalmente en pacientes de origen español ( $p < 0,001$ ), mientras que la variante L2b que se dio de forma similar en españoles y sudamericanos. Este dato junto con el resultado presentado en la figura 20, permiten sugerir que la introducción en nuestra región de las genovariantes L2b y L2/L2f constituyen dos fenómenos independientes que ocurrieron entre 2006-2007. La introducción de L2b pudo ocurrir desde Centro-Europa a través del norte de España (Barcelona y/o Bilbao)

(185, 217) que pudo tener a su vez un origen en muestras de personas procedentes de Sudamérica, mientras que la variante L2/L2f pudo haber surgido aquí (L2f solo ha sido descrita en la península Ibérica) lo que explicaría su alta proporción entre población autóctona y estrachamente relacionada con L2 que es la genovariante más prevalente en América (249). Teniendo en cuenta el elevado flujo de inmigración entre España y Sudamérica entre los años 2005 y 2007, es de esperar una ruta bidireccional de transmisión de enfermedades infecciosas como el LGV o el VIH (107). Así pues, podemos considerar como hipótesis que la variante L2/L2f llegó a España vía Sudamérica mientras que la variante L2b entró desde Europa por el Noreste de la Península Ibérica.

Desde el punto de vista de las implicaciones clínico-terapéuticas. La particular situación epidemiológica encontrada, abre la posibilidad de relacionar la forma de presentación del cuadro infeccioso con la presencia de una u otra variante. Se encontró una asociación significativa entre la presencia de la variante L2b y la aparición de dolor y hemorragia (Tabla 7). Por el contrario los casos con sintomatología leve o asintomáticos, todos presentaban la genovariante L2/L2f. Según esta asociación de genovariantes a cuadro clínico con mas sintomatología, permite sugerir que las L2/L2f tendrán más oportunidades de diseminarse en la población y si la situación perdura en el tiempo L2/L2f podrá ir desplazando a L2b, aunque también las posibilidades de identificarla serán menores. Sin embargo, la presencia de un único cambio aminoacídico entre las dos variantes, no es suficiente como para justificar una diferencia en la presentación clínica del LGV, pero podría ser un marcador pronóstico de sintomatología más grave. En relación con esto, la secuencia de *ompA* de la variante hipervirulenta L2c (250) es idéntica a la variante L2b. Si bien L2c es un recombinante entre un genotipo L2 y un genotipo D en otras regiones del genoma. La no existencia de secuencias de otras regiones genómicas de la variante L2/L2f supone una limitación a nuestras conclusiones.

Atendiendo a la eficacia del tratamiento no encontramos diferencias significativas, si bien en 3 pacientes con proctitis severa no se erradicó la cepa, estos datos no son suficientes para encontrar significación estadística. El tratamiento recomendado de doxiciclina 21 días fue el tratamiento de elección, sin embargo no existe un criterio claro para pacientes con infección persistente. En nuestro caso el tratamiento con moxifloxacino fue eficiente, sin embargo recientemente se ha recomendado como terapia de 2ª opción azitromicina (251).



## **ANEXO-II: PUBLICACIÓN**



# Clinical and epidemiological characterization of a lymphogranuloma venereum outbreak in Madrid, Spain: co-circulation of two variants

M. Rodríguez-Domínguez<sup>1,†</sup>, T. Puerta<sup>2,3,†</sup>, B. Menéndez<sup>3,4</sup>, J. M. González-Alba<sup>1</sup>, C. Rodríguez<sup>2,3</sup>, T. Hellín<sup>5</sup>, M. Vera<sup>2,3</sup>, F. J. González-Sainz<sup>1</sup>, P. Clavo<sup>2,3</sup>, M. Villa<sup>2,3</sup>, R. Cantón<sup>1,6</sup>, J. Del Romero<sup>2,3</sup> and J. C. Galán<sup>1,6</sup>

1) Servicio de Microbiología and CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), 2) Centro Sanitario Sandoval, Comunidad de Madrid, 3) Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico San Carlos, 4) Laboratorio de Microbiología, Centro Sandoval, 5) Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Ramón y Cajal and 6) Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana (RYC-CSIC), Madrid, Spain

## Abstract

The lymphogranuloma venereum (LGV) outbreak described in the Netherlands in 2003, increased the interest in the genotyping of *Chlamydia trachomatis*. Although international surveillance programmes were implemented, these studies slowly decreased in the following years. Now data have revealed a new accumulation of LGV cases in those European countries with extended surveillance programmes. Between March 2009 and November 2011, a study was carried out to detect LGV cases in Madrid. The study was based on screening of *C. trachomatis* using commercial kits, followed by real-time *pmpH*-PCR discriminating LGV strains, and finally *ompA* gene was sequenced for phylogenetic reconstruction. Ninety-four LGV infections were identified. The number of cases increased from 10 to 30 and then to 54 during 2009–2011. Incidence of LGV was strongly associated with men who have sex with men; but in 2011, LGV cases were described in women and heterosexual men. Sixty-nine patients were also human immunodeficiency virus (HIV) positive, with detectable viral loads at the moment of LGV diagnosis, suggesting a high-risk of co-transmission. In fact, in four patients the diagnosis of HIV was simultaneous with LGV infection. The conventional treatment with doxycycline was prescribed in 75 patients, although in three patients the treatment failed. The sequencing of the *ompA* gene permitted identification of two independent transmission nodes. One constituted by 25 sequences identical to the L2b variant, and a second node including 37 sequences identical to L2. This epidemiological situation characterized by the co-circulation of two LGV variants has not been previously described, reinforcing the need for screening and genotyping of LGV strains.

**Keywords:** co-circulation, L2, L2b, Lymphogranuloma venereum, Lymphogranuloma venereum-outbreak, Spain

**Original Submission:** 19 December 2012; **Revised Submission:** 4 April 2013; **Accepted:** 23 April 2013

Editor: S. Cutler

**Article published online:** 29 April 2013

*Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: 219–225

10.1111/1469-0691.12256

**Corresponding authors:** J. C. Galán, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Carretera de Colmenar, km. 9.1, 28034 Madrid, Spain

**E-mail:** jgalanm.hrc@salud.madrid.org

and

J. Del Romero, Centro Sanitario Sandoval, C/Sandoval 7, 28010 Madrid, Spain

**E-mail:** jromero.gapm07@salud.madrid.org

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work and should be considered as co-first authors

## Introduction

Lymphogranuloma venereum (LGV) cases have rarely been diagnosed in industrialized countries, but in 2003 a small LGV outbreak was described in the Netherlands among men who have sex with men (MSM) [1]. Later, further outbreaks were rapidly communicated across many European countries [2]. As a consequence, alerts about the increase in LGV cases were communicated for the European Centre for Disease Prevention

## **ANEXO-III**

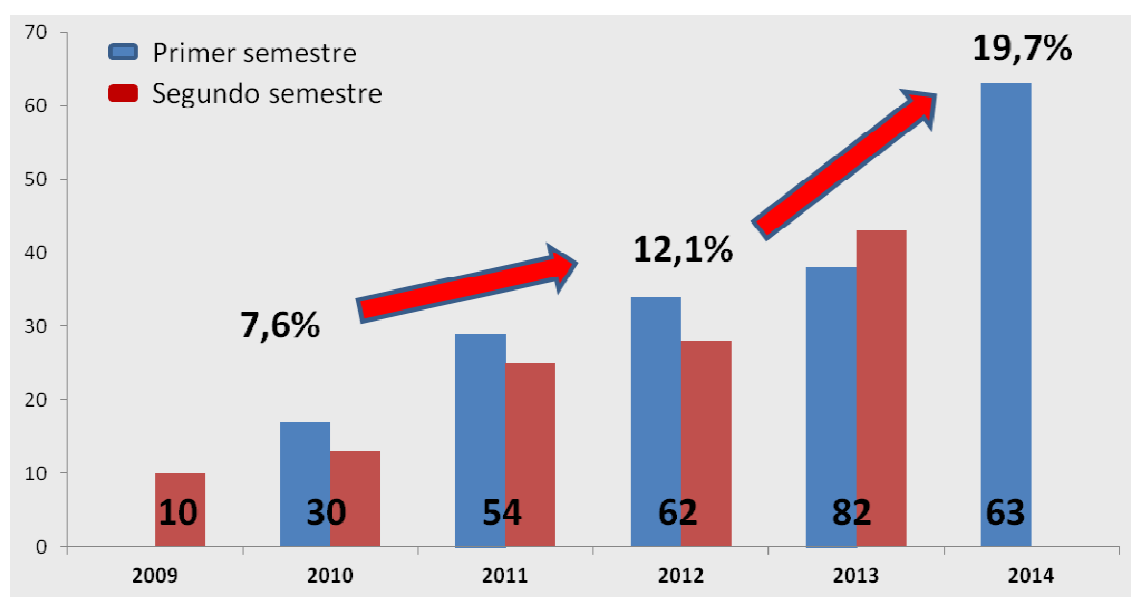




### Seguimiento de la evolución del brote de LGV los años 2012 a 2014

Como continuación del trabajo de investigación desarrollado en el curso de esta tesis, y dada la importancia de una adecuada instauración de tratamiento, la detección de genotipos de CT asociados a LGV se incorporó a la rutina diagnóstica del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal. Todas las muestras positivas para CT, tanto de este centro como del Centro Sanitario Sandoval, son procesadas para detección de genotipos LGV. Esta situación nos ha permitido valorar la evolución de la epidemia en los años sucesivos a este trabajo de investigación.

En el periodo 2012-2014, de las 1439 muestras analizadas, 207 fueron positivas por qPCR para LGV, representando de forma global el 14.1% durante todo el período, resultado que duplica el 7.6% obtenido en el periodo anterior. Por años, se produce un aumento en la proporción de casos de CT asociado a LGV, de un 12.1% en 2012 a un 19.7% sólo en el primer semestre de 2014 (Figura 14).

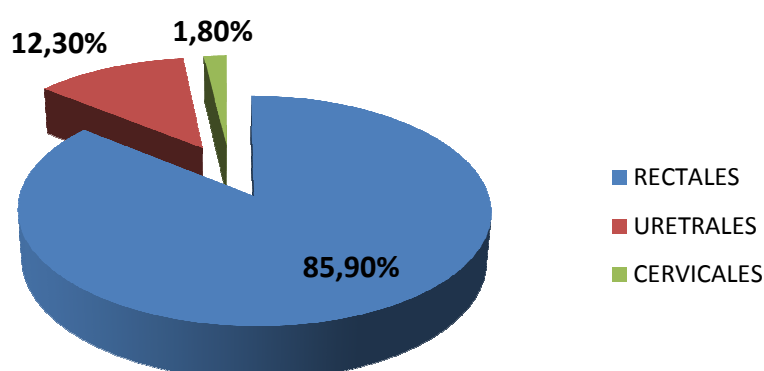


**Figura S1a.** Evolución del número de casos de LGV entre los años 2009 y el primer semestre del año 2014.

Como ya se ha comentado en la introducción de este capítulo, en los últimos años, especialmente en aquellos países con sistemas de vigilancia, se ha detectado un alarmante incremento en el número de casos de LGV (200). Por otro lado, al contrario que entre 2003-2009, han aumentado el número de casos detectados en muestras uretrales, aun siendo muy pocos en relación al número de casos encontrados en pacientes con síntomas rectales (241).

También se ha demostrado la presencia de genotipos L de CT en muestras faríngeas de pacientes HSH asintomáticos (253) lo que podría consitituir un reservorio de infección.

En España, tras los primeros casos descritos en distintas partes de nuestra geografía, los últimos datos publicados, corresponden a la situación de LGV en Barcelona (253) son coincidentes con nuestros últimos datos, que muestran un incremento en la incidencia de 32,1/10<sup>5</sup> HSH al año en 2007 a 182,7/10<sup>5</sup> HSH por año en 2012.



**Figura S1b.** Porcentaje de casos de LGV por tipo de muestra. Periodo 2011-2014.

En relación con la situación en Madrid, los datos reflejados en la figura S1a, en cuanto al aumento en el número de casos de LGV, muestran una situación similar a la que está sucediendo tanto en Barcelona como en otras partes de Europa. Se sigue manteniendo una fuerte asociación con HSH (90%) y VIH (80%), aunque cabe destacar el incremento en la detección de casos en muestras uretrales de pacientes heterosexuales y en mujeres, lo que podría confirmar un posible salto de estas infecciones desde grupos de riesgo a la población general (figura S1b), como se sugería de los datos del periodo 2009-2011.

Para la caracterización de los genotipos L encontrados, en este segundo periodo, se diseñó una PCR alelo específica sobre la mutación N162S en ompA, capaz de diferenciar entre los genotipos L2b y L2/L2f. Los primers empleados fueron: L2f\_F: 5'-AGTTGGGTTATTCGGAGATCA-3'; L2b-F: 5'-AGTTGGGTTATTCGGAGATTG-3'; L2-R: 5'-ACTCAGCTGCGTTACAGAGAA-3'. Para la amplificación, se realizó PCR convencional empleando la polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Norwalk,

EEUU) en un volumen final de 50microL conteniendo tampón de reacción (10x),  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (1,5nM), dNTPs (0.2nM), 0,6 mM de cada primer y 1,5 unidades de enzima. Las condiciones de amplificación fueron 12 minutos de desnaturalización a 94°C seguido de 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, un minuto a 59°C y 1 minutos a 72°C, seguido de un paso final de elongación durante 1.5 minutos a 72°C. La visualización de los productos amplificados se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% preteñidos con BrEt.

Se obtuvo amplificación positiva en 63 muestras correspondientes al periodo desde Junio de 2013 a Junio de 2014. La variante L2/L2f se detectó en un 65 % (41/63) de los casos (53% en el período anterior). La distribución de las dos variantes por localización anatómica se muestra en la tabla S.1.

MUESTRA	L2/L2f	L2b
RECTAL	34/63 (54 %)	18/63 (28,6%)
URETRAL	5/63 (7,9 %)	0
CERVICAL	1/63 (1,6 %)	0
ULCERA	1/63 (1,6 %)	3/63 (4,7 %)
ADENOPATIA	0	1/63 (1,6 %)
<b>TOTAL</b>	<b>41/63 (65 %)</b>	<b>22/63 (35 %)</b>

**Tabla S1.** Distribución de las variantes L2/L2f y L2b por tipos de muestra.



## **CAPITULO 2**

**PREVALENCIA DE COINFECCIONES POR  
GENOTIPOS INVASIVOS Y NO INVASIVOS DE  
*Chlamydia trachomatis*: IMPACTO ECOLOGICO Y  
EVOLUTIVO DE LA CONCURRENCIA DE DOS  
PATOTIPOS**



## **INTRODUCCIÓN**

### **1. IMPACTO ECOLÓGICO-EVOLUTIVO DE LA CO-CIRCULACION DE VARIANTES INVASIVAS Y NO INVASIVAS DE *Chlamydia trachomatis***

El brote de LGV descrito en Europa, incluyendo España, junto con la incrementada descripción y caracterización de infecciones por CT, supone un nuevo escenario epidemiológico: la co-circulación de variantes invasivas (LGV) y no invasivas (no-LGV) de una misma especie. Esta nueva realidad epidemiológica puede tener implicaciones evolutivas importantes, al existir la posibilidad de seleccionar nuevas variantes, resultado de eventos de recombinación entre genotipos invasivos y no-invasivos (250). Hasta fechas recientes, como consecuencia del ciclo biológico de CT, se asumía que esta especie tenía pocas oportunidades de intercambiar material genético con otros miembros de la misma especie o especies evolutivamente próximas (275). La reciente disponibilidad de secuencias de genomas completos de CT ha permitido realizar estudios de genómica comparada (58), revelando que el genoma de *Chlamydia* es el resultado de múltiples eventos de recombinación y por tanto posee una alta capacidad de generación de nuevas variantes (276). Además la implementación en los programas de cribado de realizar estudios de CT a población asintomática de riesgo (mujer menor de 25 años, sexualmente activa y a varones homosexuales) ha confirmado que el mayor porcentaje de las infecciones por CT ocurren de manera asintomática (263, 277, 278), lo que contribuye a la diseminación y a incrementar las posibilidades de estar simultáneamente infectado por más de un genotipo de CT.

#### **1.1. Tasas de infecciones mixtas**

Del apartado anterior se concluye que CT tiene una capacidad de generar recombinantes superior a lo que su ciclo biológico permitía suponer, pero es condición primera que más de un genotipo coexista simultáneamente en un mismo nicho ecológico, es decir en el mismo tejido o célula (54, 276). Por tanto, la probabilidad de que surja un nuevo recombinante será proporcional a la tasa de coinfecciones existente.

La prevalencia de infecciones mixtas simultáneamente causadas por diferentes genotipos de CT es <3% en Europa, EEUU o Australia (313-318). Por el contrario fuera de esas regiones las tasas de coinfecciones son mas prevalentes con porcentajes del 10% en Sudamérica, que llegan hasta 18% en Asia y superan el 21% en regiones de África (319-321). Sin embargo la información de estos datos debe ser interpretada con prudencia, pues se trata solamente de estudios puntuales en cohortes muy específicas durante periodos de tiempo



generalmente cortos. En la mayoría de los laboratorios de diagnóstico clínico, solamente se realiza la detección de CT basado en la amplificación de regiones conservadas en todas las CT (plásmido, *rrn*...). Pero una vez detectada la presencia de CT en una muestra biológica no se realizan estudios posteriores ya que el tratamiento antibiótico no cambiará si la infección es producida por uno o por más genotipos de CT. En la actualidad con la capacidad de identificar y comunicar infecciones por CT y las herramientas para poder discriminar infecciones mixtas, la implementación de esta tecnología nos permitirá tener una información más real de las tasas de coinfecciones y conocer si las posibilidades de generar recombinantes está asociado a determinadas poblaciones vulnerables o incluso si los posibles fracasos terapéuticos estén asociados a la presencia de infecciones mixtas como sugiere los resultados experimentales de Jeffrey y *col* (276) o de Suchland y *col* (322).

## **1.2 Impacto de las infecciones asintomáticas en la generación y frecuencia de infecciones por nuevas variantes**

Otro factor importante a tener en cuenta, en la posible selección de nuevas variantes, es la existencia de infecciones asintomáticas. En estos casos los pacientes están crónicamente infectados, aumentando el riesgo de coinfección, así como las consecuencias a largo plazo por la falta de una detección adecuada en un corto período tiempo. Por otro lado la existencia de redes sexuales en las que se producen múltiples y repetidos contactos sexuales podrían contribuir al mantenimiento y dispersión de estas formas recombinantes (323). Es bien conocido el elevado porcentaje de infecciones asintomáticas causadas por genotipos urogenitales no invasivos, mayoritariamente el genotipo E (324, 325), el cual es también el más prevalente en la población española (220). Agravando esta situación, los casos de LGV asintomáticos están aumentando en los últimos años. En 2003, prácticamente el 100% de los casos detectados de LGV presentaron sintomatología, pero en los últimos años se han detectado entre un 25 y un 53% de casos asintomáticos de LGV (211, 326). Si, como se comentó en el capítulo 1 de esta Tesis, los casos de infecciones por LGV están fuertemente asociados a población homosexual, donde se ha documentado la alta frecuencia de infecciones simultaneas por CT y otras ITS que refleja una alta promiscuidad asociada a la existencia de redes de contacto sexual; las oportunidades de reinfecciones por distintas variantes de CT, incluyendo formas invasivas (LGV) y no invasivas (no-LGV), en estos grupos poblacionales es alta. La tasa de reinfecciones en estas redes en un 84,2% (327). En este sentido, especial interés tienen los llamados individuos puente, moviéndose de unas redes a otras, y contribuyendo significativamente al mantenimiento de la infección (328).

En conclusión, la elevada prevalencia de infecciones por CT en determinados grupos de riesgo, asociada a la existencia de infecciones mixtas y un alto porcentaje de infecciones asintomáticas, es el tubo de ensayo perfecto para la generación de nuevas variantes de CT con impredecible comportamiento biológico y/o patogénico. Contribuyendo a agravar el problema, los individuos puente facilitarían el paso de estas nuevas variantes, de los grupos de mayor riesgo a la población general.

## **2. PREVALENCIA DE LAS INFECCIONES POR GENOTIPOS NO INVASIVOS DE *Chlamydia trachomatis***

### **2.1. Tracoma**

Las infecciones por CT son la principal causa de ceguera a nivel mundial, especialmente por su elevada prevalencia en países en vías de desarrollo. Un reciente estudio en Nepal, encuentra asociación entre otras especies de clamidia (*C. psittaci*, *C. pecorum* y *C. suis*) y el desarrollo de tracoma, sugiriendo también un posible origen zoonótico añadido a la transmisión humana de CT (329). Los serotipos asociados a la producción de tracoma son A, B y C, aunque algunos serotipos asociados a infecciones urogenitales también se pueden encontrar en muestras oculares de pacientes con conjuntivitis (330), de igual manera el serotipo B también se ha encontrado en muestras genitales de mujeres embarazadas (331), confirmando el origen común de los genotipos de tracoma y los urogenitales de los genotipos D/G/Ia/J como revelaban los estudios de reconstrucción evolutiva de CT (54, 298, 332). Pero los estudios en pacientes de zonas endémicas, con manifestaciones clínicas de tracoma, prácticamente sólo encuentran asociación con los serotipos A, B y C. Este hecho va a favor de la especificidad de nicho de los distintos serotipos de CT, de forma que podemos encontrar distintos genotipos de CT en muestras oculares y nasales de pacientes infectados pero sólo los genotipos A-C tendrían la capacidad de producir infecciones más graves y el posterior desarrollo del tracoma (333).

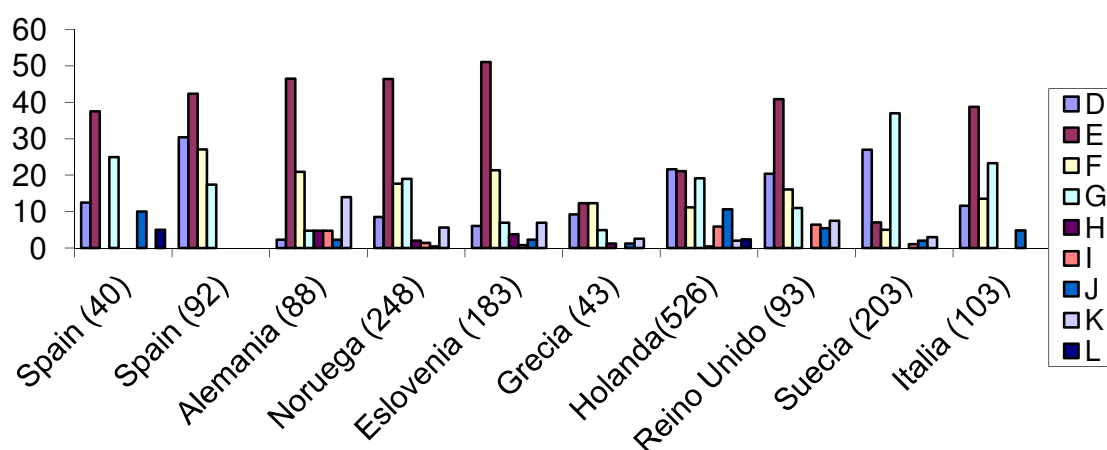
Los pocos estudios epidemiológicos realizados en zonas endémicas de tracoma, sugieren una endemicidad en cuanto a la prevalencia de los distintos genotipos asociados con la producción de tracoma. En Gambia se encontró un claro predominio del genotipo A, detectándose mayor carga bacteriana, por PCR cuantitativa, en las muestras que contenían la variante A1 con respecto a la variante A2 (333). Por otro lado, en Nepal, el genotipo más prevalente encontrado fue el C, presente en más de la mitad de las muestras estudiadas (334). En Marruecos el genotipo Ba se encontró en el 63% de los casos, seguido por el genotipo A

(335). Si bien existen pocos estudios, estos datos sugieren una distribución mundial de los genotipos B y Ba, mientras que el genotipo A sería endémico de África y el C de Asia.

## 2.2. Genotipos urogenitales no invasivos

A pesar de la escasa correlación con la clínica, el genotipado basado en *ompA* continúa hoy en día siendo el método más empleado en los trabajos sobre epidemiología molecular de CT. En general, los estudios epidemiológicos basados en la secuenciación de este gen, demuestran una mayor prevalencia del genotipo E en población general, seguido de los genotipos F, D y G, respectivamente, con algunas diferencias geográficas y poblacionales. Los genotipos H a K se encuentran de forma residual en porcentajes inferiores al 10% en infecciones urogenitales. Alguno de estos genotipos, especialmente en el caso de J/Ja, se han asociado con resolución espontánea de la infección sin necesidad de tratamiento (336).

En Europa, la excepción a esta regla la presenta Suecia donde el genotipo predominante es el G, seguido del D y con menos del 10% de los casos de genotipo E (337) (Figura 21). Esta elevada prevalencia de genotipo G puede deberse a que en el estudio se incluyeron muestras rectales, a diferencia de otros estudios que únicamente se realizan sobre muestras urogenitales o de orina. Esta elevada prevalencia del genotipo G también se ha descrito en algunas ciudades de Asia como Corea (318) y Taiwan (338).

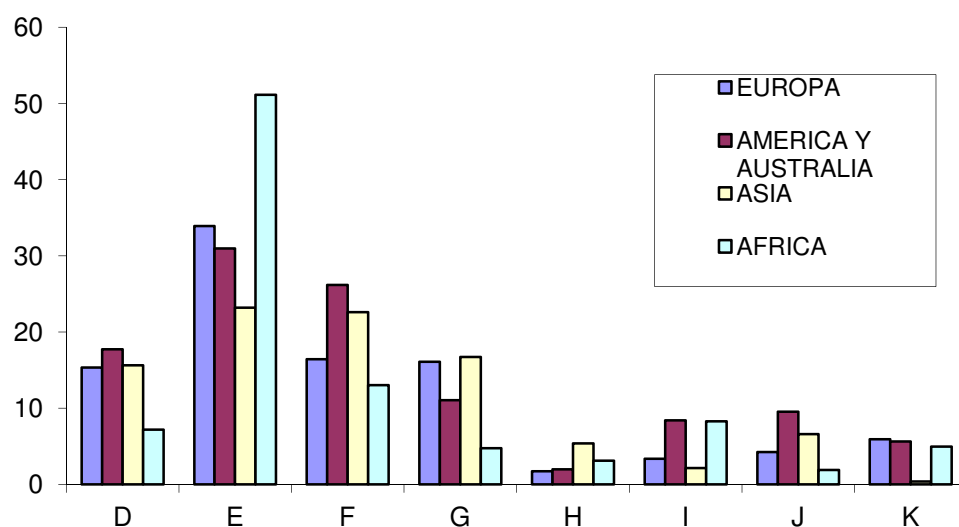


**Figura 21.** Distribución de genotipos en los distintos estudios realizados en países europeos. Entre paréntesis figura el número de muestras incluidas en cada estudio.

En América, la distribución de genotipos presenta una estructura similar a Europa, a excepción de México (339) donde el genotipo predominante fue el F, aunque se estudiaron

únicamente muestras endocervicales de mujeres no fértiles. En el caso de Australia, incluyendo muestras de orina y rectales de MSM, los genotipos más prevalentes son el D y G (317).

En África, existen pocos trabajos y están principalmente enfocados al estudio del tracoma, dada la elevada incidencia de esta enfermedad en este continente. En Túnez el 71% de los aislados genotipados correspondió al genotipo E, incluyendo muestras uretrales y cervicales (320). Por otro lado, en Irán, estudiando sólo muestras endocervicales, se encuentra una prevalencia similar de los genotipos E y F (340). (Figura 22)



**Figura 22.** Distribución de los distintos genotipos de CT por continentes

## **OBJETIVO**

- **¿Qué impacto tiene la circulación de LGV en población de alto riesgo? ¿Existe correlación entre los genotipos implicados en infecciones mixtas y los genotipos circulantes de CT? ¿Cómo influye en la epidemiología de CT?**
- Demostrar la existencia de infecciones mixtas entre genotipos asociados a LGV y genotipos no invasivos. Epidemiología molecular de los genotipos implicados y su relación con los genotipos circulantes de CT.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *1. Muestras estudiadas*

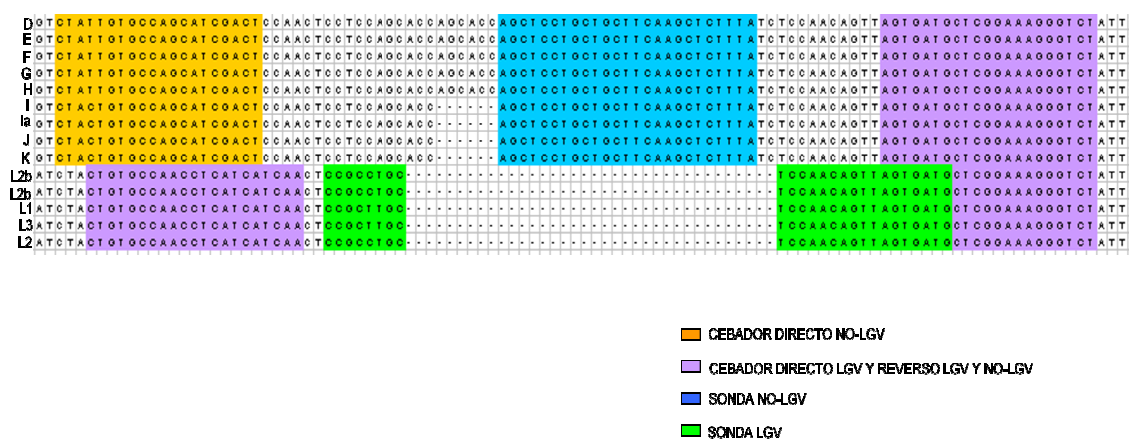
Estudio retrospectivo derivado del estudio presentado en el capítulo anterior sobre 287 muestras clínicas divididas en dos grupos:

**Grupo I:** 137 muestras recogidas entre los años 2009 a 2013, en las que previamente se había identificado la presencia del genotipo L2 o L2b causante de LGV.

**Grupo II:** 150 muestras recogidas en el mismo periodo de tiempo, en las que se había confirmado la presencia de CT pero que habían resultado negativas para genotipos relacionados con LGV. Estas muestras se dividieron en dos periodos de tiempo. *Grupo Ila:* 44 correspondientes al periodo entre los años 2009 y 2011 y *grupo I Ib:* 92 muestras recogidas en los años 2012 y 2013.

### *2. Detección de infecciones simultaneas por genotipos invasivos y no invasivos de C. trachomatis en grupo I, basado en el gen pmph*

Para la detección de genotipos no LGV, se diseñó una segunda PCR en tiempo real en la misma región del gen *pmph* empleada para la detección de los genotipos invasivos (Figura 23).



**Figura 23.-** Esquema de PCR en tiempo real para detección de genotipos L asociados a LGV y genotipos urogenitales no invasivos en muestras con infección mixta. Los cebadores morados y morado-naranja y sonda azul se emplearon para la detección de genotipos de LGV, mientras que los cebadores naranja y morado-naranja junto con la sonda verde se emplearon para detectar los genotipos urogenitales no invasivos.

Esta segunda PCR fue diseñada para detectar únicamente los genotipos no invasivos D a K, excluyendo aquellos genotipos asociados a la producción de tracoma (genotipos A-C). El protocolo se llevó a cabo en un volumen total de 25 microL conteniendo 12,5 microL de 2x

Taqman Fast PCR Master Mix (Applied Biosystems), una concentración final de cebadores (noLGV-F y LGV-R) de 150nM y 100 nM para la sonda noLGV-PB y 5 microL del DNA extraído. El protocolo PCR consistió en un minuto a 95°C para la activación de la DNA-polimerasa seguido de 40 ciclos de 94°C durante 10 segundos para la desnaturalización de las hebras de DNA y 60°C durante 30 segundos para la hibridación de cebadores y sonda y posterior elongación.

### *3. Restricción, clonado y secuenciación de *pmpH* en muestras con presencia simultánea de genotipos invasivos y no invasivos*

Como el fragmento usado para detectar la presencia simultánea de genotipos invasivos y no invasivos no era suficiente para discriminar que genotipo específico había sido detectado. En aquellas muestras donde se sospechó la presencia simultánea de ambos tipos de genotipos, se amplificó un fragmento de 430pb del gen *pmpH* siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 1. Los fragmentos amplificados fueron clonados en el plásmido pGEMt-easy ([www.promega.com](http://www.promega.com)) y transformados en la cepa de *Escherichia coli* DH5α siguiendo el protocolo descrito por Sambrook (341). De cada transformación se seleccionaron 4-6 clones y los plásmidos purificados de estas transformaciones se incubaron a 37°C en presencia de la enzima de restricción *AccI* para diferenciar genotipos conforme a los distintos patrones de restricción. Basándonos en el número de sitios de restricción que presente el fragmento amplificado podemos distinguir dos patrones. Los genotipos I, J y K presentan 2 puntos de restricción mientras que los genotipos D a H sólo presentan un punto. Por otra parte, los genotipos LGV no presentan sitio de restricción para esta enzima.

### *4. Diseño de una PCR múltiple para determinar infecciones por >1 genotipo no invasivo en muestras del grupo II*

La estrategia basada en amplificación y digestión del gen *pmpH* (*pmpH*-*AccI*) quedaba insuficiente para ver la asociación más frecuente en infecciones mixtas causadas por >1 genotipo (o infecciones simples) de CT urogenitales no invasivas. Para ello, se diseñó una PCR-anidada múltiple basada en las diferencias nucleotídicas en la secuencia del gen *ompA*. (342).

La primera PCR amplifica un fragmento de 1.124pb del gen *ompA* utilizando los cebadores P1 y OMP2 previamente descritos que hibridan en una región conservada (314). Sobre el producto amplificado se realizó una segunda PCR, utilizando 5 parejas de cebadores

(Tabla 8) diseñados sobre las regiones variables de la secuencia de *ompA*, capaces de diferenciar los genotipos D, E, F y G y de forma genérica el grupo H-K. Para la amplificación se realizó PCR convencional empleando la polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Norwalk, EEUU) en un volumen final de 50µL conteniendo tampón de reacción (10x),  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (1,5mM), dNTPs (0.2mM), 0,6 mM de cada primer y 1,5 unidades de enzima. Los cebadores fueron diseñados para las mismas condiciones de amplificación: 94°C/12' seguido de 40 ciclos de 94°C/30''+54°C/30''+72°C/1' y finalmente 72°C/10'.

<i>ompA</i> genotipo	Nombre	Secuencia (5'-3')	Posiciones	Tamaño
<b>Todos</b>	P1	ATGAAAAAACTCTTGAAATCGG	1-22	1124
	OMP2	ACTGTAAGTGCCTATTTGTCTG	1103-1124	
<b>D</b>	<i>ompA</i> -D <sub>F</sub>	AAAACGGTCAAAGCGGAGT	496-514	272
	<i>ompA</i> -D <sub>R</sub>	ATCTGTTTCCTGCTGTAAGAT	749-768	
<b>E</b>	<i>ompA</i> -E <sub>F</sub>	ACACAGATACTGCCTTCTCT	557-576	211
	<i>ompA</i> -E <sub>R</sub>	ATCAGTTCCTGCTATGAGTG	749-768	
<b>F</b>	<i>ompA</i> -F <sub>F</sub>	CACGAAACCTGCTGCAGAT	498-516	455
	<i>ompA</i> -F <sub>R</sub>	GTAATATCTACAACAGGTGTTA	932-953	
<b>G</b>	<i>ompA</i> -G <sub>F</sub>	ACGCAGCCTGCTGCAACA	499-516	454
	<i>ompA</i> -G <sub>R</sub>	GTAATATCTACAACAGGTTTTG	932-953	
<b>H-K</b>	<i>ompA</i> -H/K <sub>F</sub>	AAACACAATCTTCTARCTTTAATA	491-514	528
	<i>ompA</i> -H/K <sub>R</sub>	TCGTWTCGCTTCCGGAAG	1001-1019	

**Tabla 8.** Cebadores para asignación de genotipos basados en la secuencia del gen *ompA*

La visualización de los productos amplificados se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 2% preteñidos con BrEt. Los productos amplificados se diferenciaron en función del tamaño del amplicón (211-528bp).

### 5. Secuenciación de genes *pmpH* y *ompA* en clones sugerentes de ser variantes recombinantes

Los protocolos para la secuenciación parcial de los genes *pmpH* y *ompA* se describen en el apartado de materiales y métodos del capítulo 1 (“Secuenciación de los genes *pmpH* y *ompA*”). Por otra parte, se seleccionaron 85 secuencias de *pmpH* de muestras con infección



simple, para confirmar si el método de asignación de grupos basado en los patrones de restricción es adecuado. La secuenciación del gen *pmpH* además sirvió para diferenciar los genotipos I y J de los genotipos D-K por una delección interna de 6pb entre las posiciones 411-416 de *pmpH*. La secuenciación de estos clones sugirió casualmente la aparición de variantes recombinantes en este gen.

## 6. Análisis filogenético

Las secuencias nucleotídicas de los genes *pmpH*, *ompA*, fueron alineadas empleando el software ClustalW, implementado en el programa MEGA, y posteriormente editadas para descartar errores de secuenciación o alineamiento. Las secuencias de *pmpH* se compararon con secuencias de todos los genotipos de CT existentes en bases de datos públicas ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Atendiendo a los resultados obtenidos con los árboles basados en *pmpH* y *ompA*, para el análisis del concatenado de los genes relacionados con el tropismo en las cepas con evento de recombinación se emplearon las correspondientes secuencias de genotipos G disponibles en las bases de datos.

Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el método de máxima verosimilitud implementado en el programa PhyML 3.0 (234). El modelo de sustitución nucleotídica elegido para cada gen fue seleccionado con el software jModeltest 1.0 (233). Como test estadístico, para el cálculo del soporte de cada rama, se empleó el test aLRT (*approximate likelihood ratio test*) basado en el procedimiento de Shimodaira-Hasegawa. (235). Los valores superiores al 70% fueron considerados significativos. Para la filogenia datada se empleó el método bayesiano de cadenas de Markov (MCMC) implementado en el programa BEAST v1.5.74. En el caso de genes no recombinantes se realizó un concatenado y dos cadenas MCMC se analizaron durante 400 millones de generaciones (235). El árbol definitivo se editó con el software FigTree v1.3.1.

## 7. Detección de eventos de recombinación

El análisis de posibles eventos de recombinación se llevó a cabo utilizando el programa 3beta27 (RDP3) (344). Para reconfirmar los posibles eventos de recombinación detectados, se realizaron nuevos análisis filogenéticos empleando los fragmentos asignados, correspondientes a los diferentes genotipos, de acuerdo a las posiciones implicadas en el evento de recombinación.

## **RESULTADOS**

### *1. Detección de coinfecciones por genotipos invasivos y no invasivos*

La qPCR para la detección de infecciones por CT urogenitales no invasivas, se realizó en 137 muestras clínicas en las que previamente se había identificado la presencia de genotipos invasivos asociados a LGV (grupo I). Se detectó la presencia concomitante de genotipos no invasivos en 15/137 (10,9%) de las muestras analizadas (Tabla 9).

En relación con el origen de la muestra, 9/15 (60%) fueron muestras rectales, 3/15 (20%) correspondieron a muestras de exudado uretral y 3/15 (20%) procedían de muestras de cérvix. Todas las muestras rectales y uretrales en las que se detectó coinfección procedían de hombres homosexuales y todos presentaban sintomatología severa, incluyendo dolor, sangrado y secreción purulenta. En el caso de las muestras de cérvix, una de las mujeres no presentaba síntomas mientras que las otras dos presentaban una sintomatología inespecífica como dolor abdominal y leucorrea.

### *2. Identificación de genotipos no invasivos en muestras con coinfecciones basado en los genes *pmpH* y *ompA**

En las 15 muestras en las que se detectó infección múltiple, los fragmentos de *pmpH* amplificados, clonados en pGEMt-easy, transformados en *E. coli* y posteriormente purificados y digeridos con la enzima de restricción *AccI*, presentaron patrones de restricción que hacían sugerir que solo los genotipos D-H estaban presentes en las infecciones simultaneas con genotipos asociados a LGV. Para una identificación más específica de estos genotipos, se realizaron PCRs anidadas en el gen *ompA* que se describen en el apartado de materiales y métodos. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 9.

Muestra	Infecciones múltiples		Genotipos	
	LGV positivo	LGV negativo	LGV positivo	LGV negativo
Rectal	9/114 (7.9%)	7/66 (10.6 %)	<b>D</b> 4/9 (44.4 %)	<b>D</b> 6/7 (85.7 %)
			<b>E</b> 5/9 (55.5 %)	<b>E</b> 5/7 (71.4 %)
				<b>F</b> 3/7 (42.8 %)
			≥2 genotipos 3/9 (33.3%) <sup>a</sup>	
Uretral	3/18 (16.6 %)	7/44 (15.9 %)	<b>E</b> 3/3 (100%)	<b>D</b> 4/7 (57.1 %)
				<b>E</b> 4/7 (57.1 %)
				<b>F</b> 4/7 (57.1 %)
				<b>G</b> 2/7 (28.5 %)
Cérvix	3/3 (100 %)	7/28 (25 %)	<b>E</b> 3/3 (100%)	<b>D</b> 5/7 (71.4 %)
				<b>E</b> 5/7 (71.4 %)
				<b>F</b> 3/7 (42.8 %)
				<b>G</b> 2/7 (28.5%)
				≥2 genotipos <sup>b</sup> 1/7 (14.2 %)
Faringe	ND	1/12 (8.3 %)	ND	<b>E + F</b>
TOTAL	15/137 <sup>c</sup> (10.9 %)	22/150 (14.6 %)	<b>D</b> 5/15 (33.3 %)	<b>D</b> 15/22 (68.2 %)
			<b>E</b> 11/15 (73.3 %)	<b>E</b> 15/22 (68.2 %)
			<b>F</b> 1/15 (6.6 %)	<b>F</b> 1/22 (50.0 %)
			<b>G</b> 1/15 (6.6 %)	<b>G</b> 4/22 (18.1%)
			≥2 genotipos 3/15 (20%) <sup>a</sup>	≥2 genotipos <sup>b</sup> 1/22 (4.5 %)

**Tabla 9.-** Porcentaje de coinfecciones en pacientes con o sin infección simultanea por LGV, en función de la localización. ND No detectado. <sup>a</sup>Genotipos en infecciones múltiples E/D, E/G and E/F. <sup>b</sup>Genotipos D/G/F. <sup>c</sup>2 muestras de adenopatía con solo un genotipo LGV.

El genotipo E se encontró en 11/15 (73,3%) de las muestras con dos o más genotipos. El segundo genotipo más prevalente fue el D, encontrado en 5/15 (33,3%) casos, mientras que los genotipos F y G fueron encontrados en un solo caso cada uno y siempre asociados a otro genotipo no invasivo, además del genotipo L. Es destacable que en tres ocasiones (20%) se detectó la presencia de más de un genotipos no invasivos junto al genotipo L. Atendiendo al

origen de las muestras, el genotipo E se encontró en todas las muestras uretrales y de cérvix, mientras que el genotipo D exclusivamente se detectó en muestras rectales de hombres homosexuales.

### *3. Caracterización de genotipos urogenitales no invasivos en muestras clínicas donde la presencia de LGV fue excluida*

Para entender mejor la significación ecológica del hallazgo de los genotipos urogenital no invasivo (genotipos D-K), en muestras donde la presencia de un genotipo urogenital invasivo asociado a LGV ya había sido hecha, se realizó un ensayo similar al anterior pero en esta ocasión con muestras donde la presencia de genotipos asociados con LGV había sido excluida, pero donde la infección por CT no invasivos (genotipos D\_K) había sido confirmada (grupo-II). Se seleccionaron 150 muestras en el mismo período de tiempo y de acuerdo a los patrones de restricción con el enzima *AccI*, del fragmento de *pmpH* amplificado, 14 muestras clínicas (9,3%) presentaron un patrón con dos sitios de restricción, sugiriendo la presencia de variantes pertenecientes al grupo de los genotipos I, J y K. Las restantes 136 muestras se sometieron a la PCR genotipo-específica basada en el gen *ompA*. Se identificó el genotipo E como el más prevalente detectándose en 57/150 casos (38,0%), seguido de los genotipos D y F que se encontraron en 42/150 (28,0%) y 37/150 (24,6%) de los casos, respectivamente. El genotipo G se detectó en 24/150 (17,6%) de las muestras.

En 22 muestras de las 150 analizadas se detectó más de un genotipo no invasivo (14,6%). En estas muestras los genotipos E, D, F y G estaban presentes en 15, 15, 11 y 4 casos respectivamente, siendo la asociación más frecuente la presencia simultánea de los genotipos E y D en 9/22 casos. De forma añadida, en un caso se detectó una infección triple en la que estaban implicados los genotipos D, F y G. Esta muestra correspondía a un exudado de cérvix (Tabla 9).

### *4. Análisis temporal de la distribución de genotipos*

El muestreo realizado permite agrupar las muestras en dos períodos de tiempo, el primer periodo entre los años 2009 y 2011 (grupo IIa), corresponde a los primeros casos de LGV detectados en la Comunidad de Madrid (capítulo 1), y el segundo, dos años después, entre 2012 y 2013 (grupo IIb) (anexo capítulo 1). La caracterización de genotipos circulando en ambos períodos de tiempo demostró una epidemiología estable (Tabla 10), lo que sugiere que la distribución local de genotipos no ha cambiado a consecuencia de la introducción de casos de LGV en la población.

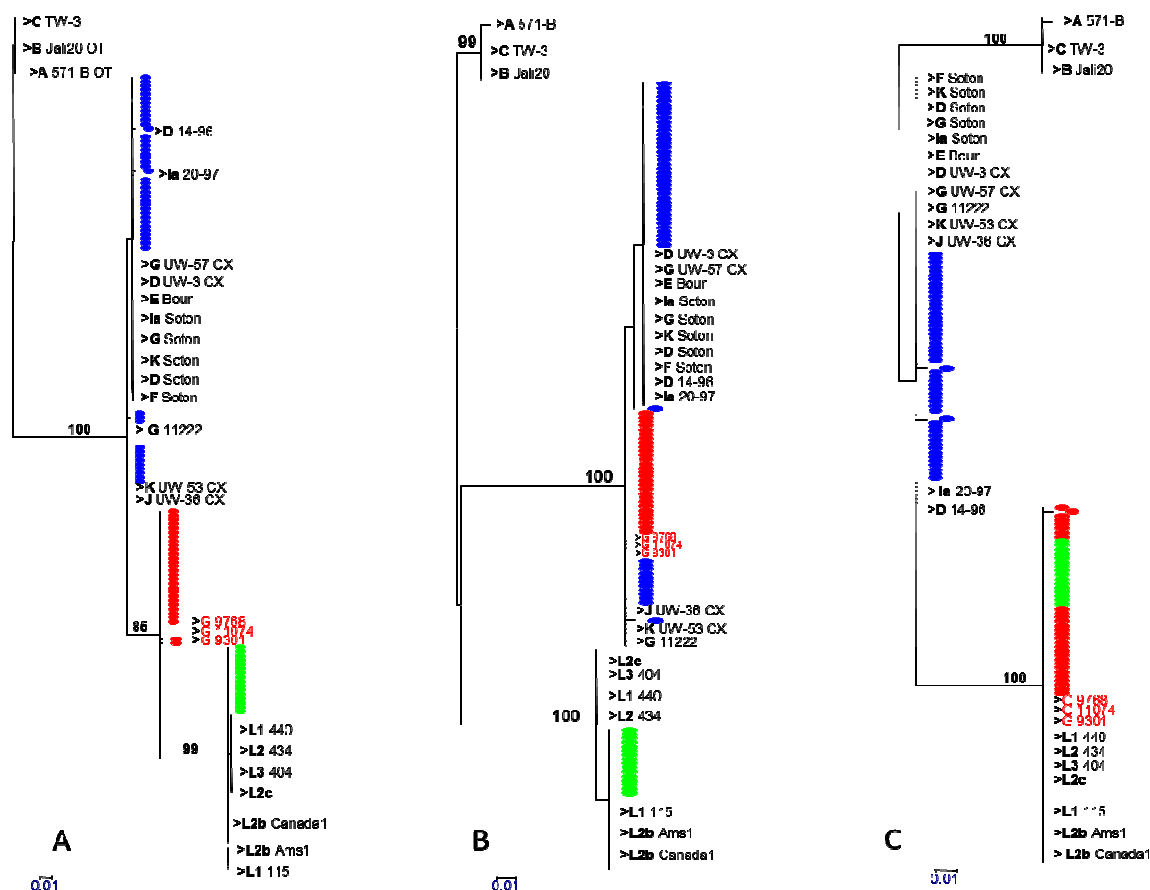
GENOTIPO	2009-2011	2012-2013	TOTAL
D	14/50 (28%)	28/100 (28%)	42/150 (28%)
E	18/50 (36%)	39/100 (39%)	57/150 (38%)
F	12/50 (24%)	25/100 (25%)	37/150 (24%)
G	8/50 (16)	16/100 (16%)	24/150 (17,6%)
H-K	6/50 (12%)	8/100 (8%)	14/150 (9,3%)
≥2 genotipos	8/50 (16%)	14/100 (14%)	22/150 (14,6%)

**Tabla 10.** Distribución de genotipos por periodos de tiempo en muestras no LGV.

### 5. Reconstrucción filogenética e identificación de nuevos recombinantes

En el curso de este estudio, la secuenciación del gen *pmpH* fue requerida como control del protocolo basado en la restricción con *AccI*, diseñado para identificar la presencia de genotipos no invasivos en muestras con genotipos LGV. En base a los patrones de restricción, se analizaron 85 secuencias de *pmpH* correspondientes a distintos genotipos (LGV, D-H, I-K).

Como era de esperar, la topología del árbol filogenético, comparando con secuencias de referencia, mostró un excelente poder discriminatorio entre los tres principales patotipos de CT, tracoma, urogenital no invasivo y LGV (Figura 24A). La concordancia fue total entre la asignación previa basada en los patrones de restricción y la identificación basada en secuenciación del gen *pmpH* (25/85 muestras se agruparon en el cluster LGV, 25/85 muestras en el grupo de genotipos D-H y 12 en el grupo I-K). Sorprendentemente, 23/85 secuencias inicialmente identificadas como pertenecientes al grupo de los genotipos D-H, se agruparon en una rama independiente, con un valor de bootstrap >85, y no asociadas a ningún genotipo de referencia (figura 24A). La posición de la rama en el árbol filogenético sugiere un posible evento de recombinación.



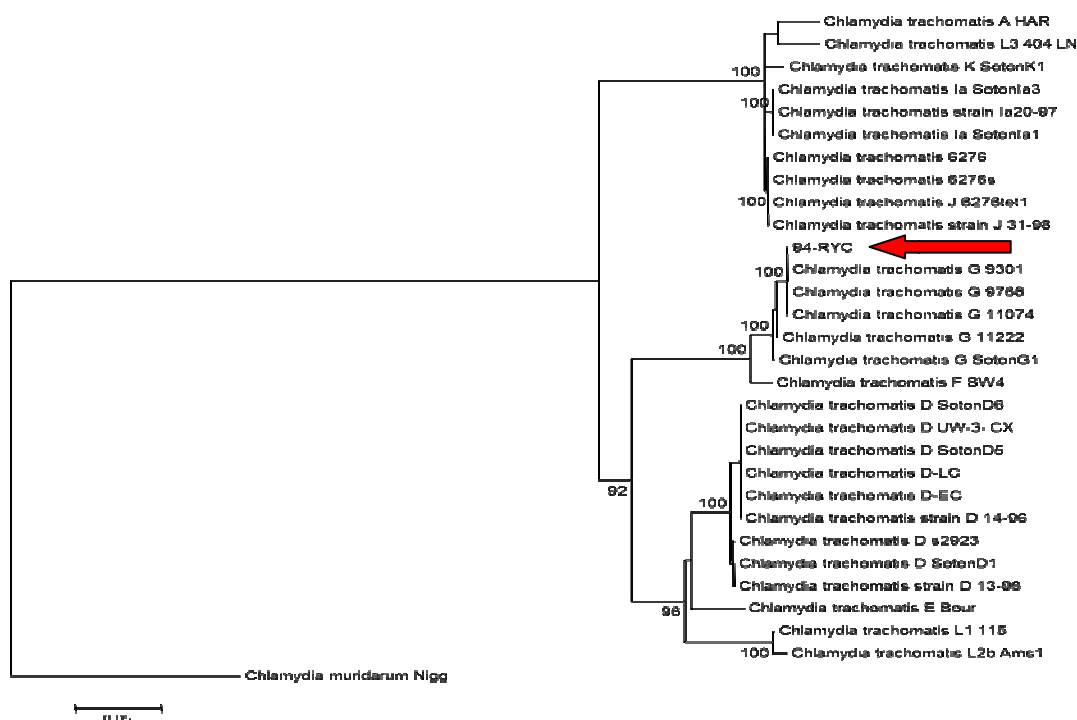
**Figura 24.** Reconstrucción filogenética de los diferentes genotipos de *C. trachomatis* basado el fragmentos del gen *pmpH*. A) Reconstrucción basado en 430 bp del gen *pmpH* (correspondiente a las posiciones nucleotídicas 393-800 comparando con el genotipo de referencia D (aislado UW-3); B) Reconstrucción basada en 236 bp del gen *pmpH* (correspondiente a las posiciones nucleotídicas 393-555 y 726-800). C) Reconstrucción filogenética basada en 171 bp del gen *pmpH* (correspondiente a las posiciones nucleotídicas 555-726). Las muestras secuenciadas en este estudio están marcadas en círculos de colores. En verde las secuencias agrupadas con los genotipos asociados con LGV; en azul las secuencias agrupadas con los genotipos urogenitales no invasivos (En la figura A pueden diferenciarse, sin soporte estadístico, las secuencias agrupadas como pertenecientes a los genotipos D-I, de las pertenecientes a los genotipos J-K); En rojo las secuencias identificadas como intermedias entre LGV y urogenitales no-invasivas. Se enraizaron en la base del árbol las secuencias de los genotipos de referencia (A-C) relacionadas con tracoma. Los números sobre las ramas reflejas el valor estadístico de cada rama.

El posterior análisis bioinformático, usando el programa Rdp3, confirmó un posible evento de recombinación en el fragmento de *pmpH* en las 23 secuencias analizadas. La recombinación detectada se produce entre un genotipo del grupo urogenital no invasivo (Figura 24B) y un fragmento de genotipo L (correspondiente a las posiciones 555-726) asociado al LGV (Figura 24C). Las cepas de referencia G-9768, G-11074 y G9301, descritas en Seattle, EEUU, presentaban idéntico evento de recombinación (Figuras 24A-C).

La identificación de un único evento de recombinación sugiere la selección de una única variante que se originó una sola vez y posteriormente se diseminó en la población. En todos los casos se detectaron en muestras rectales de pacientes HSH, que presentaban sintomatología muy leve o estaban asintomáticos. El 50% de los pacientes que portaban esta variante también presentaban infección por VIH. En cuanto al país de origen de estos casos, la distribución fue similar en españoles (36,6%), y extranjeros (46,6%), el resto de los casos (16,8%) el país de origen no fue conocido.

#### 6. Caracterización molecular y evolutiva de la nueva variante recombinante

Una vez identificada la circulación, en nuestro entorno, de una nueva variante entre la población HSH, se comprobó, siguiendo el esquema de asignación de genotipos descrita en esta Tesis (basado en el concatenado de los genes *ompA-pmpH*), como podía identificarse mejor esta variante.



**Figura 25.** Reconstrucción filogenética, por el método de máxima verosimilitud, del concatenado de genes *pmpH-ompA*. La variante recombinante (flecha roja) se encuentra estrechamente relacionada con aislados del genotipo G.

En primer lugar el análisis filogenético de 1.288 bp de *ompA-pmpH*, confirmó la estrecha relación entre la variante recombinante descrita en Madrid y los aislados del genotipo G descritos en Seattle entre los años 2000-2002 (Figura 25).

## DISCUSIÓN

En este 2º capítulo analizamos el impacto del brote de LGV en la epidemiología molecular de CT en Madrid, ya que cabe esperar que durante brotes epidémicos la posibilidad de coexistir dos o más genotipos en una misma célula es mucho mayor (345) y por tanto más frecuentemente se produzcan eventos de recombinación (y por tanto de selección de nuevas variantes), como ocurrió en la descripción de la variante L2c de LGV, resultado de un evento de recombinación entre L2b y D (250). De hecho se describe por primera vez, en este capítulo, la circulación entre población de HSH, de una variante recombinante entre LGV y un genotipo urogenital no-invasivo, probablemente del genotipo G. Esta forma recombinante ha sido previamente descrita en EEUU entre los años 2000-2002. Este hallazgo sugeriría una nueva vía de entrada de variantes de CT, entre España y Norte-América que se suma a las sugeridas en capítulo 1º desde Centro-Europa a España y desde Latino-América a España. La reciente descripción de una variante L2b de LGV portando la mutación L173I y L173F en EEUU (247), idéntica a la descrita por nosotros y otros grupos en España (346, 347), permite confirmar la existencia, directa o indirecta, de una vía de transmisión entre Norte-América y España. Este escenario revela la compleja epidemiología molecular de CT en nuestro entorno.

Por otra parte, los altos porcentajes de infecciones simultáneas por genotipos no invasivos de CT (14,6%), y entre genotipos invasivos y no-invasivos (10,9%), más relacionado con países en vías de desarrollo (296, 319, 321) que con países europeos (348, 349) es un escenario idóneo para la selección y dispersión de nuevas formas recombinantes. Este preocupante dato contribuye a una visión más compleja, pero más real, de la epidemiología de CT en España, uno de los países con mayores afluencias de grandes grupos poblacionales (inmigrantes y turistas), permitiendo la confluencia de variantes de diferentes regiones geográficas, desde donde se pueden dispersar a otras regiones, como ha ocurrido en VIH (350), pero también un país con la potencialidad de generar y dispersar nuevas formas recombinantes. La epidemiología molecular de CT en España es un buen modelo para constatar la rápida evolución de esta especie bacteriana. Sin embargo, sorprendentemente, España no cuenta con un sistema de vigilancia de las infecciones por CT.



Antes de la era genómica, considerábamos que la evolución de CT era exclusivamente basada en mutación. En la era post-genómica, según trabajos recientes, la recombinación en CT parece ser mucho más frecuente que lo esperado para un patógeno intracelular obligado como es CT (54), si bien se estima que ocurre de 10 a 100 veces menos frecuentemente que las mutaciones puntuales (298, 301). De cualquier manera, el requisito necesario para que la recombinación intergenómica tenga lugar, es la coexistencia en un mismo nicho de dos o más genotipos diferentes de CT. Cuando en este estudio se analizó la prevalencia en la población general de genotipos no-invasivo más frecuentes en infecciones simples y mixtas. En ambos casos se observó la misma proporción, siendo el genotipo E el más frecuente (57 infecciones simples y 15 infecciones mixtas), seguido del genotipo D (42 y 15 respectivamente), genotipo F (37, 11), G (24, 4) y I-K (14 y 0 respectivamente). La caracterización de genotipos en infecciones simples, revela que la epidemiología molecular local de CT es similar a otros países europeos (351-353). Aparentemente la similar prevalencia de genotipos en infecciones simples y mixtas revela que no existe ninguna asociación beneficiosa entre genotipos concretos. Por otro lado, el estudio de las prevalencias de los genotipos más frecuentes asociados a co-infecciones que impliquen genotipos asociados con LGV reveló igualmente una mayor proporción de genotipos E y D (mas prevalente en población de HSH) y minoritariamente de F y G (solo fueron encontrados en un caso cada uno). Un dato similar se encontró en Holanda, donde los genotipos E y D fueron los más comunes en coinfecciones en individuos con LGV (349). De este segundo estudio comparativo se deduce que tampoco existe una asociación ventajosa entre LGV y ningún genotipo urogenital no-invasivo. Finalmente, si consideramos la distribución de genotipos en dos períodos de tiempo, el primero de ellos correspondiente a la detección de los primeros casos de LGV en la Comunidad de Madrid y en segundo período después de 5 años, no se observa ninguna diferencia en cuanto a la distribución de los principales genotipos, revelando que el impacto del brote de LGV no ha alterado sustancialmente, la epidemiología local de las infecciones por CT.

De lo anteriormente se deduce que de surgir un recombinante entre formas invasivas y no-invasivas este ocurrirá más frecuentemente entre L2/L2b y genotipo E o genotipo D (como describe *Somboonna y col.* en la caracterización de la variante L2c). Sin embargo en nuestro entorno encontramos una forma recombinante entre LGV y una cepa perteneciente al genotipo G, avalando que probablemente este genotipo no se

seleccionó en nuestro entorno. Otra hipótesis sobre el surgimiento de esta variante (no excluyente con el anterior) puede estar relacionada con el tropismo tisular por el epitelio rectal observado en genotipo G (348, 349, 354) y la alta prevalencia de detección de variantes L2/L2b de LGV en muestras rectales de HSH. Esta asociación entre tropismo y epidemiología temporal puede explicar la asociación y selección de variantes específicas (337). Además, los aislados pertenecientes al genotipo G, muestran un mayor grado de mosaicismo genético (301) como consecuencia de eventos de recombinación, lo que revela una mayor probabilidad para la recombinación en esta especie. Por lo tanto una posible explicación, es que la variante recombinante LGV/G llegó a Madrid, diseminándose en la población HSH, hecho facilitado por la ausencia de síntomas y la estructura en redes sexual característica de este grupo poblacional. Los sucesivos eventos de transmisión han ido ocasionando cuellos de botella dando lugar a la acumulación de mutaciones, capaces de diferenciar los aislados encontrados en Madrid de los descritos en Seattle (como las variantes filogenéticamente más próximas).

Otro aspecto importante derivado de este trabajo es la descripción de variantes recombinantes, en genes relacionados con la patobiología de CT, como es el gen *pmpH* que abre un nuevo punto de discusión en cuanto al diagnóstico y genotipado de esta especie. Si en los años anteriores hemos aprendido que el gen *ompA* (sobre el que está basada la asignación de genotipos) no permitía establecer correctamente la asociación con los diferentes patotipos de CT (51, 355), y fue necesario identificar nuevos genes que permitieran realizar una correcta asignación de las variantes de CT relacionados con los patotipos (291). Así se determinó (en introducción general) como algunos genes, tales como *pmp* (305) podrían haber evolucionado en paralelo con los tres grupos que causan enfermedad en humanos. La posibilidad de identificar variantes recombinantes en estas nuevas dianas puede poner en cuestión la utilización de este marcador genético para la asignación precisa de patotipos.

A medida que se generalicen los estudios sistemáticos de epidemiología molecular de bacterias como CT progresivamente aprenderemos a comprender el impacto de los flujos migratorios, de las redes sexuales, las dianas de detección, o la selección de nuevas variantes exitosas en una determinada región. Un estudio de epidemiología molecular en EEUU sobre parejas heterosexuales reveló 9 nuevas formas recombinantes, representando un 32% de la población estudiada, aunque en ninguno de esos variantes se pudo establecer un éxito adaptativo (356).



## **ANEXO-IV: PUBLICACIÓN**



RESEARCH ARTICLE

# High Prevalence of Co-Infections by Invasive and Non-Invasive *Chlamydia trachomatis* Genotypes during the Lymphogranuloma Venereum Outbreak in Spain

Mario Rodriguez-Dominguez<sup>1,2</sup>, Jose Maria Gonzalez-Alba<sup>1,3</sup>, Teresa Puerta<sup>4,5</sup>, Blanca Menendez<sup>5,6</sup>, Ana Maria Sanchez-Diaz<sup>1</sup>, Rafael Canton<sup>1,2</sup>, Jorge del Romero<sup>4,5</sup>, Juan Carlos Galan<sup>1,3,7\*</sup>



**1** Servicio de Microbiología Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain, **2** Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Madrid, Spain, **3** CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain, **4** Centro Sanitario Sandoval, Madrid, Spain, **5** Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain, **6** Laboratorio de Microbiología, Centro Sandoval, Madrid, Spain, **7** Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana (RYC-CSIC), Madrid, Spain

\* [juancarlos.galan@salud.madrid.org](mailto:juancarlos.galan@salud.madrid.org)

## OPEN ACCESS

**Citation:** Rodriguez-Dominguez M, Gonzalez-Alba JM, Puerta T, Menendez B, Sanchez-Diaz AM, Canton R, et al. (2015) High Prevalence of Co-Infections by Invasive and Non-Invasive *Chlamydia trachomatis* Genotypes during the Lymphogranuloma Venereum Outbreak in Spain. PLoS ONE 10(5): e0126145. doi:10.1371/journal.pone.0126145

**Academic Editor:** Deborah Dean, University of California, San Francisco, University of California, Berkeley, and the Children's Hospital Oakland Research Institute, UNITED STATES

**Received:** October 24, 2014

**Accepted:** March 29, 2015

**Published:** May 12, 2015

**Copyright:** © 2015 Rodriguez-Dominguez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** MRD's work is supported by a contract of the Spanish Network Research Infectious Disease (REIPI), Ministry of Economy and Competitiveness, Instituto de Salud Carlos III, and cofinanced by the European Development Regional Fund "A way to achieve Europe" (ERDF).

## Abstract

The evolution of *Chlamydia trachomatis* is mainly driven by recombination events. This fact can be fuelled by the coincidence in several European regions of the high prevalence of non-invasive urogenital genotypes and lymphogranuloma venereum (LGV) outbreaks. This scenario could modify the local epidemiology and favor the selection of new *C. trachomatis* variants. Quantifying the prevalence of co-infection could help to predict the potential risk in the selection of new variants with unpredictable results in pathogenesis or transmissibility. In the 2009–2013 period, 287 clinical samples with demonstrated presence of *C. trachomatis* were selected. They were divided in two groups. The first group was constituted by 137 samples with *C. trachomatis* of the LGV genotypes, and the second by the remaining 150 samples in which the presence of LGV genotypes was previously excluded. They were analyzed to detect the simultaneous presence of non-LGV genotypes based on *pmpH* and *ompA* genes. In the first group, co-infections were detected in 10.9% of the cases whereas in the second group the prevalence was 14.6%, which is the highest percentage ever described among European countries. Moreover, bioinformatic analyses suggested the presence among men who have sex with men of a *pmpH*-recombinant variant, similar to strains described in Seattle in 2002. This variant was the result of genetic exchange between genotypes belonging to LGV and members of G-genotype. Sequencing of other genes, phylogenetically related to pathotype, confirmed that the putative recombinant found in Madrid could have a common origin with the strains described in Seattle. Countries with a high prevalence of co-infections and high migration flows should enhance surveillance programs in at least their vulnerable population.

## **CAPÍTULO 3**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR,  
DISTRIBUCIÓN Y EVOLUCIÓN (A TIEMPO  
REAL) DE LA VARIANTE RECOMBINANTE  
IDENTIFICADA EN LA POBLACIÓN DE  
MADRID**

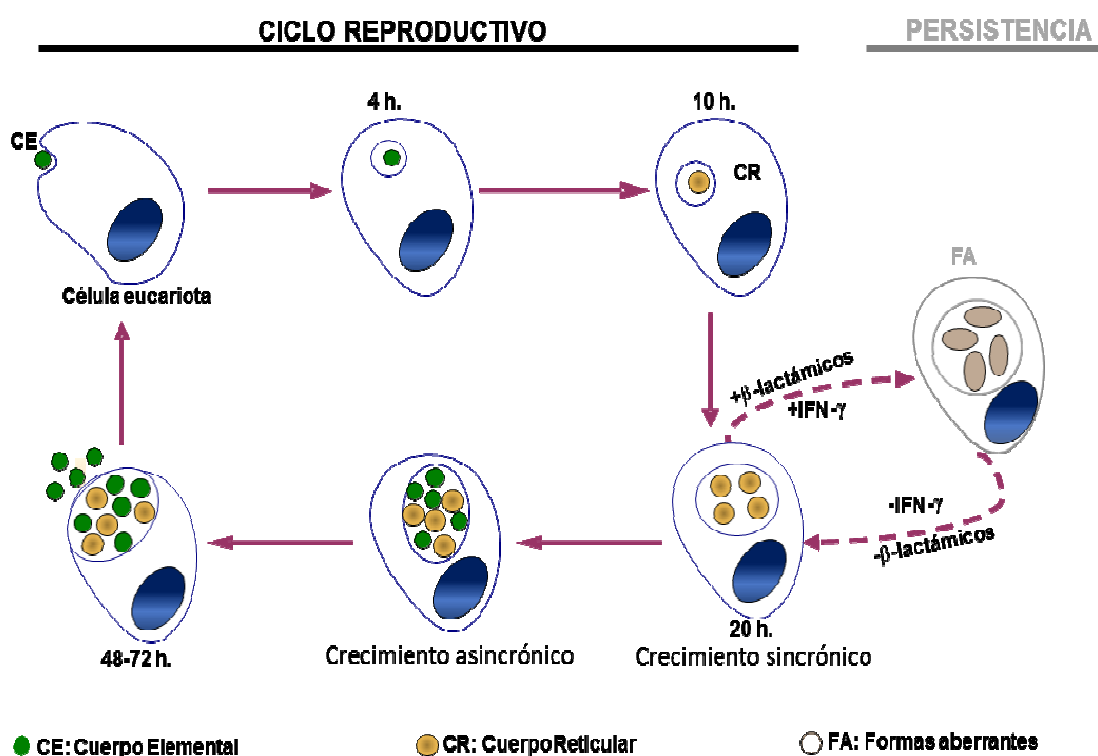




## INTRODUCCIÓN

### 1. IMPORTANCIA DEL CICLO BIOLÓGICO DE *Chlamydia trachomatis*

La principal característica unificadora de todos los miembros del orden *Chlamydiales* es la necesidad de completar su ciclo biológico en el interior de la célula eucariota. Las clamidias tienen un ciclo biológico bifásico único que alterna entre dos formas morfológicamente bien diferenciadas. El cuerpo elemental (CE), extracelular y metabólicamente inactivo es la forma infecciosa con capacidad de diseminarse e invadir células susceptibles. El cuerpo reticular (CR) que es metabólicamente activo y capaz de reproducirse por fisión binaria en el interior celular (figura 26).



**Figura 26.** Ciclo de desarrollo biológico de *Chlamydia*. (362)

El CE está perfectamente adaptado al medio extracelular ya que su membrana externa contiene una gran cantidad de proteínas (MOMP, Omp2, Omp3) muy ricas en aminoácidos azufrados, responsables de la rigidez y escasa permeabilidad de CE (363). Sin embargo CE es incapaz de replicarse por división, requiriendo la penetración al interior de la célula eucariota para continuar su ciclo biológico. Una vez en el interior del fagosoma, comienza un proceso

de reorganización o diferenciación del CE a CR. Los CR se dividen por fisión binaria (crecimiento sincrónico), observándose un crecimiento exponencial dentro del fagosoma hasta 8-10 bacterias (figura 26), con un tiempo de duplicación de 2-3h, que dura ~12 a 20 horas (aunque algunos patotipos como los implicados en LGV tiene una velocidad de crecimiento mayor). Tras este ciclo de crecimiento, comienza una nueva reorganización de los CR para formar una inclusión madura (CE). Esta segunda reorganización no es un proceso sincrónico, es decir que coexisten CR en reproducción junto a CE maduros. El mecanismo de liberación no se conoce aún con exactitud. Generalmente los CE son detectados en el medio extracelular tras la lisis de la célula hospedadora, lisis que se produce como consecuencia de la liberación tardía de enzimas lisosomales así como por la acción de una proteasa de origen clamidial. El proceso global del ciclo de desarrollo biológico es de 48-72h.

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (igualmente otras condiciones de stress como por la presión inmunológica o la falta de nutrientes) (364) previenen la maduración de los CR a CE (paso de crecimiento sincrónico a crecimiento asincrónico), proceso denominado citoquinesis. El CR no puede dividirse aunque la replicación de DNA continúa, por lo que el CR se deforma, alargándose por la acumulación de múltiples copias de ADN (365). Cuando el antibiótico es aclarado del medio, se restaura el ciclo replicativo, por lo que estas formas aberrantes (deformes y con múltiples copias de ADN) son consideradas formas clamidiales de persistencia y frecuentemente asociada con fracaso de tratamiento (si bien las infecciones por clamidias no son tratadas con antibióticos  $\beta$ -lactámicos, si el tratamiento de uretritis gonocócica, frecuentemente asociada con coinfección por CT, requiere ceftriaxona  $\pm$  azitromicina) (263, 366).

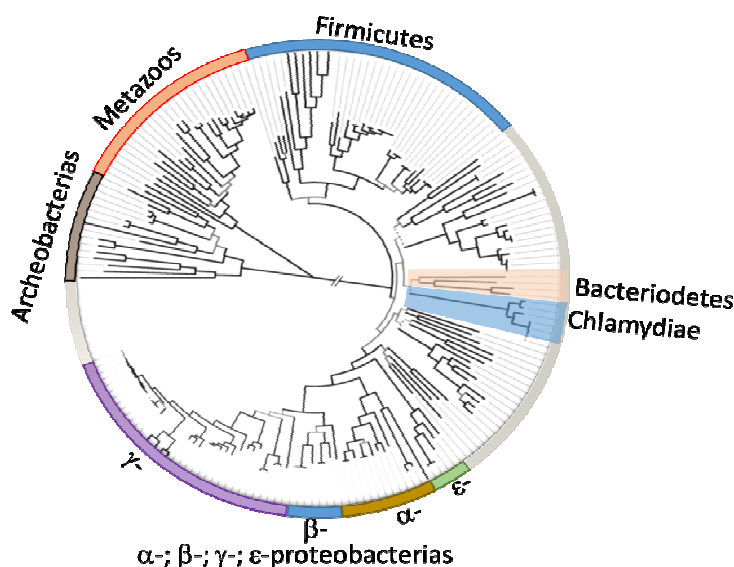
Este hallazgo, descrito en los años 70 (367), pero solo recientemente bien caracterizado ha planteado dos cuestiones muy interesantes: a) Si tradicionalmente CT ha sido reconocido como un ejemplo de bacteria que carece de péptidoglicano y por tanto de PBPs (*penicillin binding proteins*), diana de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, ¿cómo es posible que esta familia de antibióticos tenga un efecto sobre clamidias?, y b) La acumulación de múltiples copias de ADN, podría facilitar, en un escenario de coinfección el intercambio de material genético?. Estas aparentes contradicciones empiezan a ser aclaradas. Recientemente se ha podido demostrar la presencia de un nuevo tipo de peptidoglicano, cuya síntesis es crucial para el ciclo biológico de las chlamidias (368, 369). El tratamiento con inhibidores del peptidoglicano como fosfomicina o  $\beta$ -lactámicos generan formas aberrantes. Sin embargo el efecto de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos no estaría relacionado con inhibición de PBPs sino

inhibición de AmiA, una carboxipeptidasa (con motivo de unión similar a PBPs) necesario en la síntesis de los precursores del péptidoglicano (370)

Por otra parte, Wang y col. han demostrado que la cepas de chlamydias con fenotipo de forma aberrante inducido por  $\beta$ -lactámicos, tienen mayor capacidad para recibir ADN por transferencia horizontal (371), revelando que a pesar de su ciclo biológico, las especies de CT pueden obtener por recombinación material genético.

## 2. POSICIÓN FILOGENÉTICA DE *Chlamydia trachomatis*. ¿AISLAMIENTO GENÉTICO?

La característica más conocida, y en gran medida responsable de la separación de este orden del resto del reino Eubacteria, es su capacidad de colonizar el nicho intracelular, lo que supone un aislamiento del resto de bacterias y limita, a priori, su capacidad de intercambio genético.

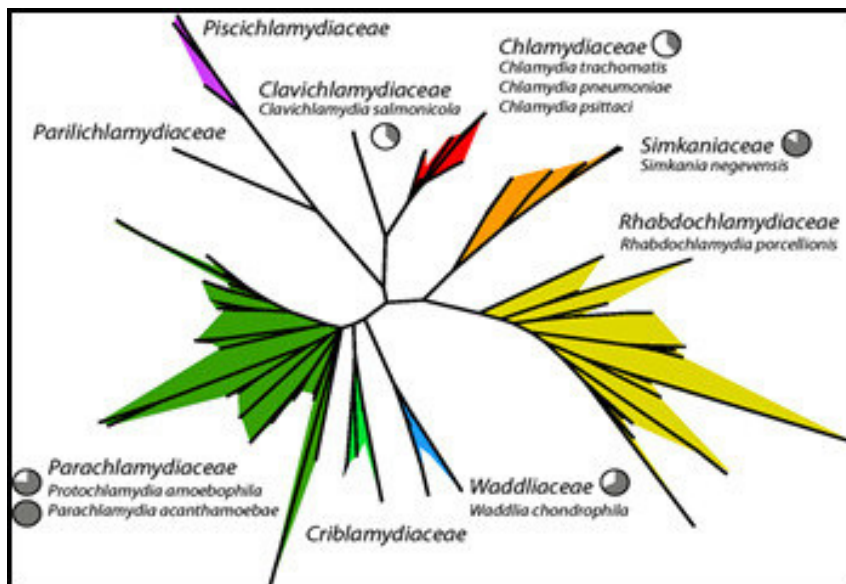


**Figura 27.** Situación filogenética del phylum *Chlamydiae* (372)

Chlamydiales están filogenéticamente aisladas y no resulta fácil asignarlas a alguno de los principales grupos bacterianos. Esta idea en términos evolutivos significa que no hay un reloj molecular lo suficientemente preciso con el cual poder medir la evolución de CT. Recientemente secuencias de 16s rDNA de endosimbiontes de amebas relacionados con *Chlamydia* (*Parachlamydia amoebophila*) han sido detectado en la heces de chimpancés

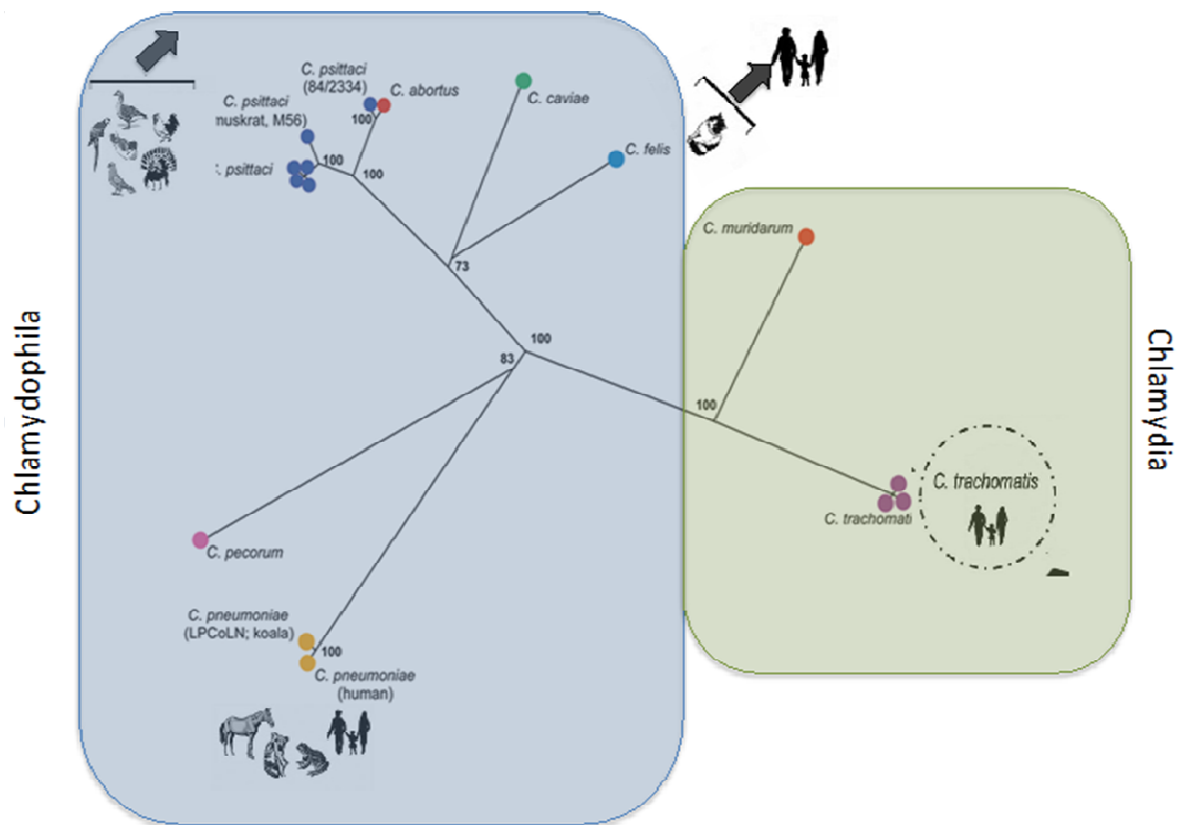
(357), convirtiéndose en la especie evolutivamente más próxima a las Chlamydiales. El reloj molecular permite estimar que ambas especies se separaron hace 700 millones de años (299), mientras que la emergencia de los primeros homínidos, único hospedador de CT, ocurrió hace no más de 6 millones de años (358), lo que indica que CT se originó mucho antes que sus únicos hospedadores. Esta aparente contradicción no ha sido resuelta. Basado sobre la secuencia del 16S rADN, las especies evolutivamente más próximas a *Chlamydiae* son los microorganismos de vida libre *Verrucomicrobia* y *Lentisphaera* (373, 374).

Hasta finales de los años 90, se pensaba que las chlamydias eran exclusivamente patógenas de células de mamífero. Sin embargo el desarrollo de los métodos genéticos ha supuesto una revolución en el estudio de este orden bacteriano tan particular. Nos ha permitido conocer que *Chlamydiae* también tiene la capacidad de sobrevivir como endosimbionte en amebas de vida libre. Por otra parte el desarrollo de los métodos de secuenciación junto con los estudios de genómica comparada ha permitido identificar hasta 7 nuevas familias pertenecientes al orden *Chlamydiales*: *Clavochlamydiaceae*, *Criblamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Piscichlamydiaceae*, *Rhabdochlamydiaceae*, *Simkaniaceae* y *Waddliaceae* (Figura 28). Algunas de estas familias engloban especies patógenas para el hombre como *Parachlamydia acanthamoeba*, *Simkania negevensis* o *Rhabdochlamydia spp* (375). A pesar de esto, este orden sigue manteniendo su aislamiento genético y su separación del resto de miembros del reino Eubacteria (Figura 27).



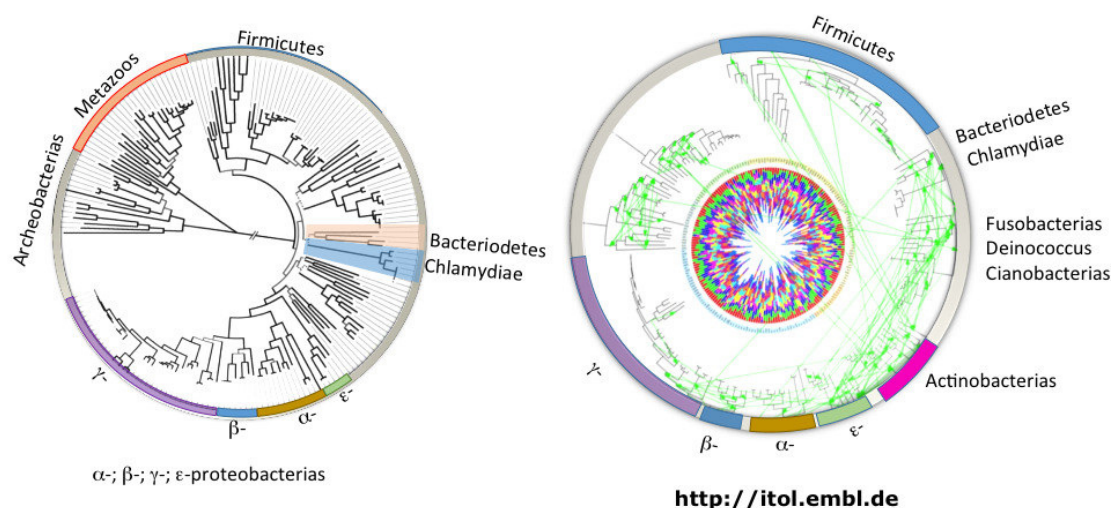
**Figura 28.** Relación filogenética de las nuevas familias del phylum *Chlamydiae* descritas.

En 1999, basándose en el análisis de los genes 16S y 23S rDNA, (376) propusieron que el género *Chlamydia* se subdividiera en 2 géneros: *Chlamydia* y *Chlamydophila*, (figura 29) sin embargo esta propuesta no ha sido plenamente aceptada en la comunidad científica y ha prevalecido la propuesta de un único género con varias especies.



**Figura 29.** Análisis filogenético de las 8 especies de *Chlamydia*, basado en la secuencia concatenada de 7 genes *housekeeping*. Se muestra la diferenciación propuesta por Everett y col en 1999, aunque no haya sido finalmente aceptada por la comunidad científica (360).

La secuenciación de genomas completos, unido al enorme desarrollo de sistemas bioinformáticos ha revelado que la recombinación en *Chlamydia* podía ser más frecuente de lo que su biología podría hacernos pensar. El análisis disponible en [www.itol.embl.de](http://www.itol.embl.de) muestra (flechas verdes) revela el intercambio de material genético entre los grandes grupos de bacterias (figura 30).



**Figura 30.** Representación de la tasa de recombinación sobrerrepresentada sobre el árbol filogenético de la vida descrito de Ciccarelli en 2006. Las imágenes proceden de la página [www.iol.embl.de](http://www.iol.embl.de). (377)

Así la mayor frecuencia de recombinación ocurre entre Actinomycetos y el grupo de Fusobacterium, Deinococcus y Cianobacterias, también se observa alta tasa de recombinación intraclado en las archeobacterias, mientras que los Chlamydiales han recibido ancestralmente, material genético fundamentalmente desde proteobacterias (figura 30) (377). Estos resultados, que serán posteriormente nuevamente comentados en el apartado 4.5 de este capítulo cuestionan que si bien su ciclo biológico intracelular y la posición filogenética actual de *Chlamydia* (alejada de otras formas de vida) harían pensar en un aislamiento genético, pero los datos recientes sugieren que la recombinación ancestral (y actual) ha tenido (y tienen) un peso evolutivo muy importante.

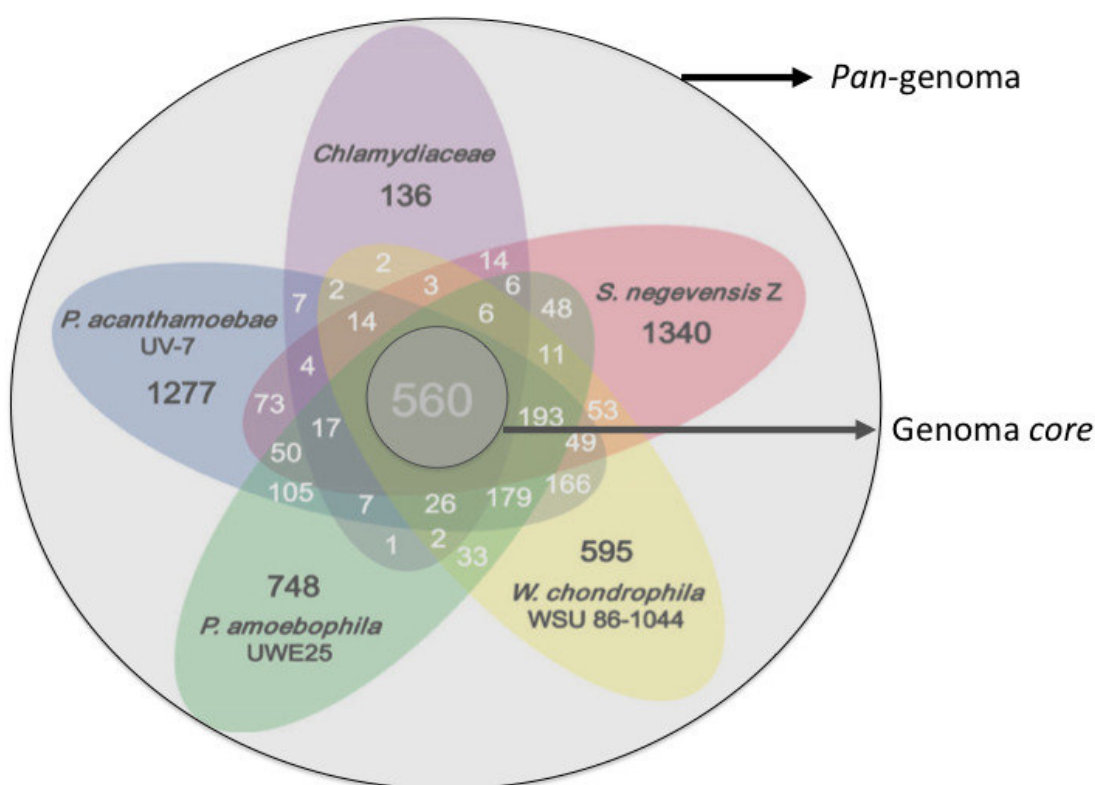
### 3. EL PANGENOMA DE *Chlamydia* Y EL GENOMA DE *Chlamydia trachomatis*

La publicación en 1998 del primer genoma de CT, perteneciente al serovar D (304), supuso uno de los mayores avances en el conocimiento de la biología de esta bacteria y la secuenciación de genomas bacterianos próximos a *Chlamydia* que son simbioses en otras especies (amebas) (378), permite realizar análisis de genomas comparados, ofreciendo una visión más amplia de la diversidad genómica entre los *Chlamydiae* y así nuevas posibilidades de investigar la evolución de este grupo único de bacterias.

El genoma de *Chlamydia* está compuesto por algo más de 1 millón de pares de bases (1.04-1.23 Mb, aproximadamente el 25% del genoma de *Escherichia coli*), constituyendo

junto con los micoplasmas, las especies bacterianas con los genomas más pequeños; Sin embargo, *Waddlia Simkania* y *Parachlamydia*, las especies ambientales más próximas a *Chlamydia*, tienen unos tamaños genómicos 2-3 veces mayores (2,14, 2,50 y 2,97 Mb respectivamente), sugiriendo que han sufrido muy diferentes trayectorias evolutivas en su proceso de adaptación a la vida intracelular que le ha permitido perder algunas rutas metabólicas, como la síntesis de aminoácidos, o la fermentación anaeróbica. La gran reducción del genoma de CT podría estar relacionado con un tiempo mayor de vida intracelular (el 99% de las proteínas pertenecen a familias presentes en todos los organismos intracelulares).

El análisis comparado de genomas completos de especies bacterianas ha traído la generalización de dos nuevos conceptos: *genoma-core* y el *pan-genoma*. Se define el *genoma-core* como el conjunto de genes presentes en todos los miembros de un grupo (sea género o especie), si bien se aplica generalmente a especies bacterianas. El *pan-genoma* constituye los genes accesorios o genes presentes en algunos miembros de ese grupo. La disponibilidad de secuencias genómicas de *Chlamydia* y especies relacionadas (como *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae* y *Waddliaceae*), permite definir ambos conceptos.

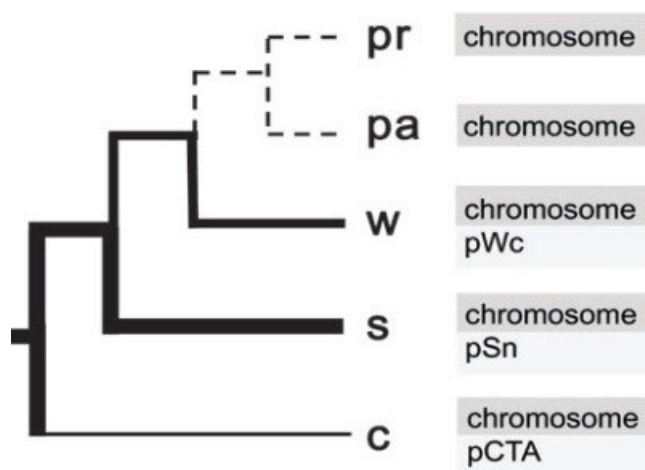


**Figura 31.** El genoma-core y el pan-genoma de *Chlamydiae*. (378)

Para definir el *genoma-core* del orden *Chlamydiae*, el punto de partida es la especie con el menor tamaño: *Chlamydia trachomatis* que tiene 895 potenciales proteínas. De éstas, 560 hipotéticas proteínas son comunes entre todos los miembros (62,5%) (378). De estos genes una inusual alta proporción están relacionados con genes adquiridos de un ancestro común a partir de las plantas (379). Conforme a la figura 31, si el *genoma-core* está constituido por 560 hipotéticas proteínas, el *pan-genoma* serían 5.167 hipotéticas proteínas (5,77 veces el *genoma* de CT). Para las cepas pertenecientes a la especie CT, el *genoma-core* y *pan-genoma* son prácticamente idénticos, por ejemplo los genotipos A y D de CT son 99,6% idénticos (se discute en el siguiente apartado).

El análisis del *genoma* de CT revela que *Chlamydia* codifica un número mínimo de genes necesarios para la replicación, la transcripción y la traslación; Sin embargo los sistemas de reparación y recombinación están ampliamente representados indicando que *Chlamydia* tiene, al menos teóricamente, una enorme capacidad recombinatoria (380). También es característica de este grupo bacteriano la presencia de un plásmido de unos 7.500 pb, ubicuo en los miembros de este género. El plásmido críptico de CT es un plásmido no conjugativo, (probablemente derivado de un plásmido conjugativo de *Simkania*) donde su replicación está íntimamente unida al ciclo de replicación de la bacteria. El porcentaje de divergencia entre plásmidos de *Chlamydia* y especies relacionadas oscila entre 69-99% (381), mientras que en el caso de aislados de CT la homología es  $\geq 99\%$  (382). Esta alta homología, junto con su número de copias (8-10 por cepa) (383) y la presencia en prácticamente en todos los aislados (solo alrededor de 1% de las cepas carecen de plásmido y estas son menos infectivas) (97) ha justificado que el plásmido sea diana diagnóstica cuando se emplea las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Los datos filogenéticos de los plásmidos muestran una concordancia evolutiva con el cromosoma de las mismas especies, es decir la topología de un árbol filogenético de las especies es similar a la del árbol filogenético de los plásmidos de esas mismas especies (378), sugiriendo que en cada especie cromosoma y plásmido han co-existido durante largo tiempo (figura 32). O expresado de otra manera, la captación de ADN plasmídico probablemente ocurrió en una única ocasión hace mucho tiempo y posteriormente ha co-evolucionado con el ADN cromosómico en cada especie bacteriana.





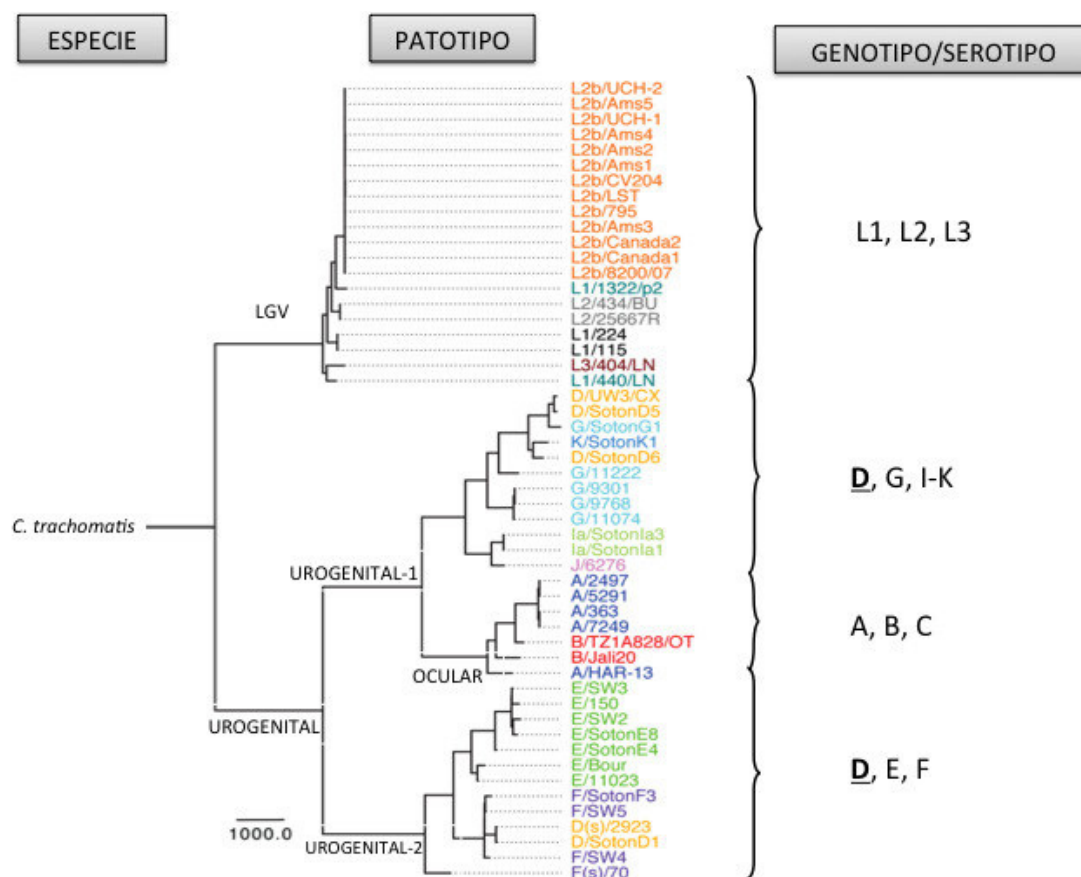
**Figura 32.** El árbol filogenético de 16S rDNA de *Waddlia* (W), *Simkania* (S) y *Parachlamydia* (P) es idéntico al árbol filogenético basado en región *tra* de los plásmidos encontrados en esas mismas especies.

En los años sucesivos decenas de genomas han sido publicados en las bases de datos, representando a todos los serotipos. Los análisis filogenéticos y de genómica comparada han permitido determinar las zonas del genoma más susceptibles a cambios evolutivos, conocido como la zona de plasticidad, así como aquellas zonas más conservadas implicadas en procesos esenciales dentro del ciclo biológico de la bacteria. Estas zonas de plasticidad han sido sugeridas que sean puntos más propensos a eventos de recombinación. Aún hoy, gran parte de esos genes únicos de CT, sin ortólogos en el resto de bacterias, continúan siendo de función desconocida.

Por otro lado, una limitación de estos estudios es que se han limitado al estudio de cepas de referencia, bien adaptadas al laboratorio, existiendo pocos trabajos que demuestren la reproducibilidad de estos hallazgos en aislados de muestras clínicas contemporáneas. Este hecho, está principalmente relacionado con la necesidad de obtener crecimiento en cultivos celulares, dada la dificultad técnica de obtener secuencias de genomas completos a partir de muestras clínicas. Aunque recientemente se han publicado algunas metodologías basadas en el enriquecimiento y posterior secuenciación profunda de aislados de CT a partir de muestras clínicas, sin necesidad de cultivo celular (384, 385, 386).

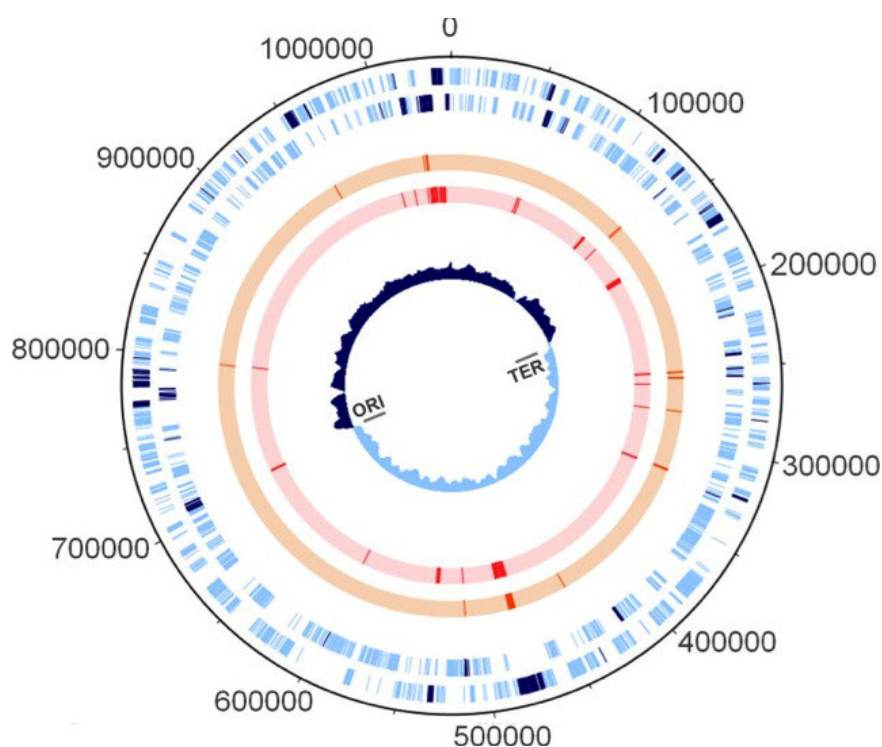
#### 4. FILOGENIA Y EVOLUCIÓN EN *Chlamydia trachomatis*

Como se ha comentado en la sección anterior, la homología entre diferentes aislados de CT es  $\geq 99\%$ , además la organización genómica mantiene un alto grado de similitud (sintenia) y el genoma-*core* y el pan-genoma están constituido por prácticamente los mismos genes; sin embargo existen tres patotipos bien diferenciados: Tracoma (genotipos A-C), urogenitales no-invasivos (genotipos D-K) y linfogranuloma (genotipos L1-L3) resultado de un diferente tropismo por células humanas (célula columnar del epitelio ocular, células de la mucosa genital o de los fagocitos mononucleares), incluso dentro de un mismo patotipo podemos encontrar grandes diferencias clínicas, como los cuadros desde proctitis severa a linfadenopatía inguinal asociado a LGV-L2 (346), entonces ¿que define el tropismo?. (Figura 33)



**Figura 33.-** Árbol filogenético obtenido por el método de máxima verosimilitud de genomas completos de CT, excluyendo recombinación. *Adaptado de (54).*

No se han identificado genes específicos, presentes exclusivamente en cada uno de las cepas que definen un patotipo, por lo que cabe esperar que las diferencias en cuanto al tropismo tisular, la invasividad o la capacidad de evadir el sistema inmune radiquen en mutaciones puntuales en genes presentes en cepas de todos los patotipos. Si el tamaño del genoma de CT es 1,04 Mb-1,24 Mb y el porcentaje de divergencia es  $\sim 1\%$ , quiere decir que de las  $10^6$  pb del genoma bacteriano, aproximadamente 10 Kb son diferencias polimórficas. La distribución de mutaciones puntuales es muy heterogénea a lo largo del cromosoma, identificándose un número de genes cuyos productos muestran alta variabilidad y podrían modular la severidad de la enfermedad. Entre este grupo de genes con alta variabilidad, solo aquellos genes bajo selección positiva ( $dN/dS > 1$ , es decir genes que han sido sometidos a procesos de adaptación) y que filogenéticamente muestren relación congruente con los patotipos son (o deben ser) los mejores candidatos para explicar el tropismo observado dentro de CT.



**Figura 34.** Mapeo cromosómico de los *loci* implicados en la evolución direccional de CT. Las franjas rojas de los círculos naranja y rosa muestran los genes bajo selección positiva en CT. (300)

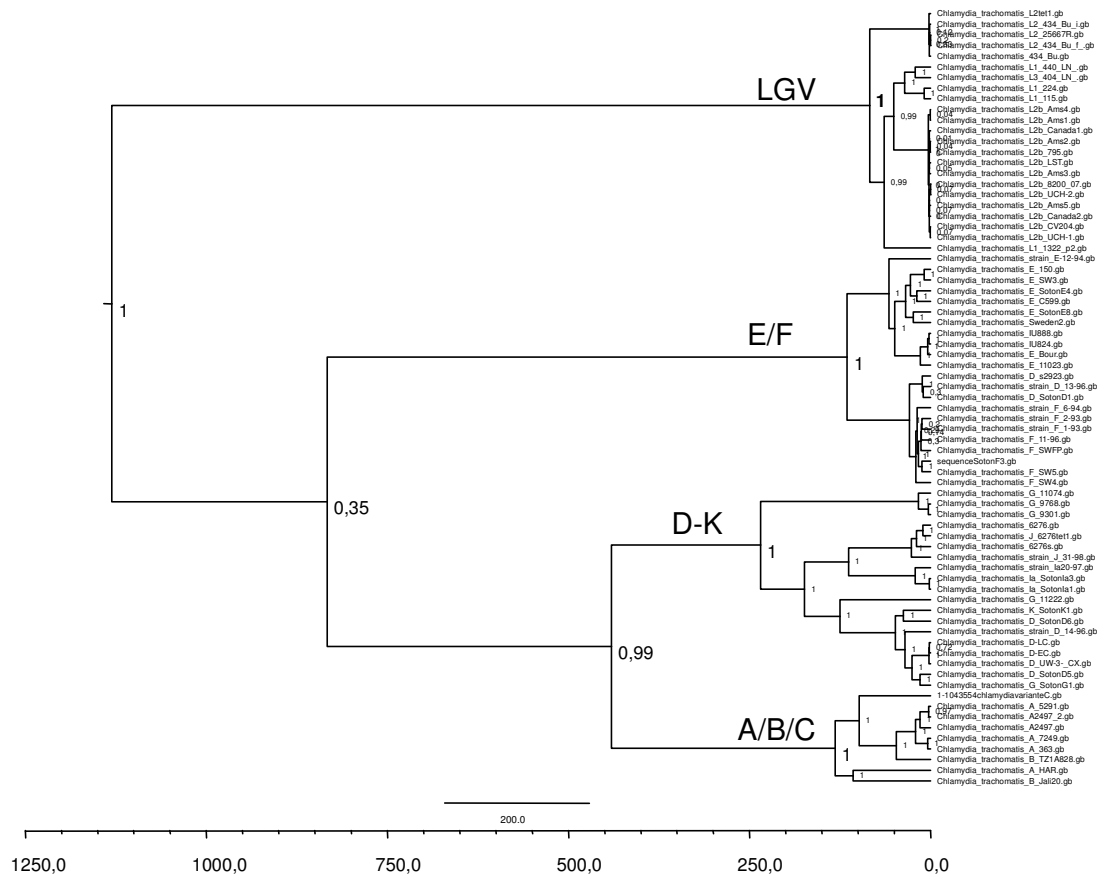
Como se observa en la figura 34, los genes bajo selección positiva se distribuyen a lo largo del cromosoma bacteriano. Por otra parte, es lógico presuponer que para cada patotipo, los genes bajo selección positiva fueran diferentes, pues diferentes son los nichos ecológicos a

colonizar (300). Hay una fuerte evidencia bioinformática basada en el análisis de genomas completos, de genes o familias de genes (que cumpliendo los criterios anteriormente expuestos) implicados en la supervivencia intracelular y la diversidad patogénica entre las cepas. Entre esas, 6 de las 9 proteínas Pmp y la familia de proteínas Inc correspondientes a las proteínas de inclusión están entre las más prominentes dianas para las cuales hay una amplia evidencia acumulada de su papel en mecanismos biológicos, tales como la adhesión o la evasión del sistema inmune. En esta línea, el trabajo de Borges y *col.* confirma como específicos genes de Pmp, inc o tarP tiene un papel diferente en cada patotipo. Así entre las cepas urogenitales no invasivas se identifican los genes *pmpH* (CT872), *tarP* (CT456) e *inc* (CT223) como los mejores candidatos a ser responsables del patotipo y virulencia de los genotipos A-K de CT (300).

El plásmido críptico de CT también ha despertado gran interés en el estudio de la virulencia de esta bacteria. Los trabajos previos que revelan como los escasos ejemplos de cepas carentes de plásmidos son menos virulentos (97). Los estudios moleculares derivados de esta observación revelaron como la dosis infectivas entre 2 cepas isogénicas de LGV eran 400 veces mayor en aquellas variante que carecía de plásmido, (387) debido a que el producto del gen *pgp4* del plásmido es un regulador transcripcional de genes cromosómicos implicados en virulencia (388). Estas 2 evidencias: *pgp4* como regulador transcripcional de genes de virulencia y la falta de virulencia en cepas carentes de plásmidos permitieron atribuir al plásmido críptico un papel fundamental en la virulencia de CT. Finalmente se planteó que las cepas con un mayor número de copias plasmídicas (>10 copias/cepa) tendrían una mayor virulencia. Sin embargo los estudios sobre el número de copias no han revelado una asociación directa entre mayor número de copias y mayor virulencia (389)

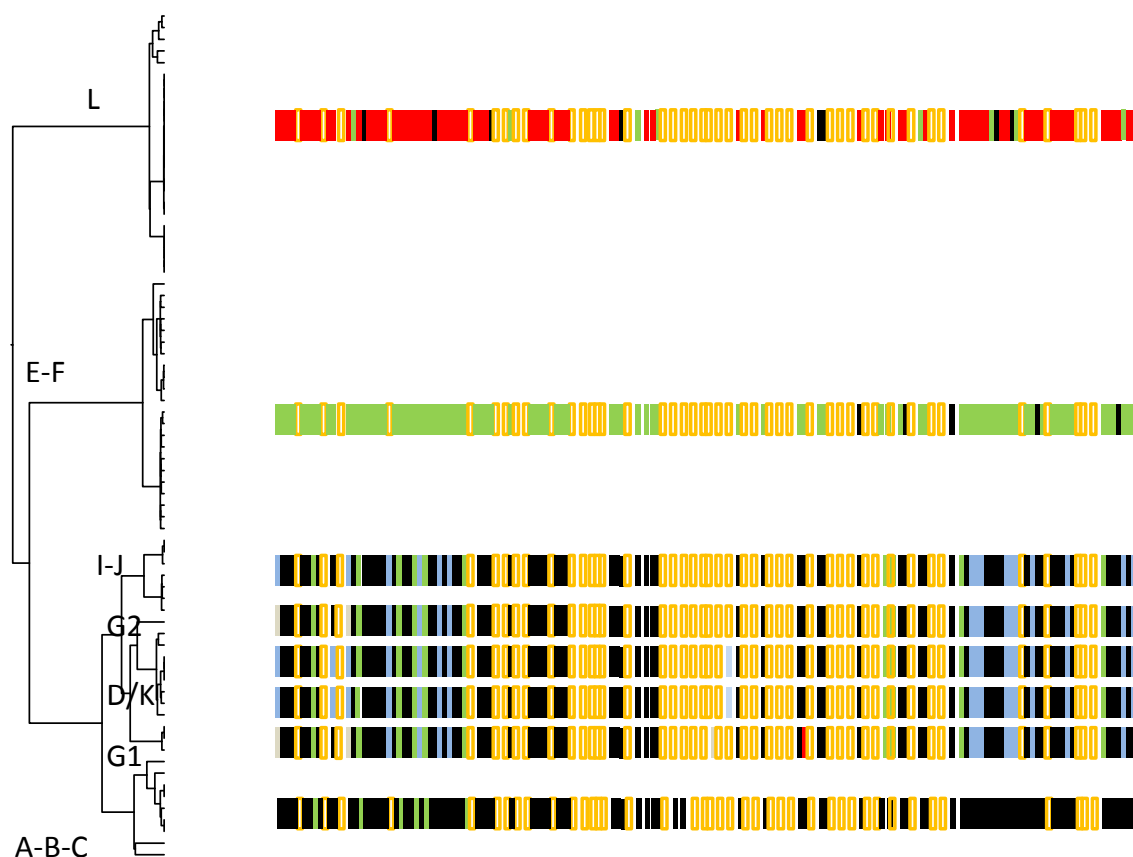
#### **4.1. Sobre el origen y evolución de las variantes de *Chlamydia trachomatis***

El grado de sintenia dentro de CT es >98%, por lo que las discrepancias fenotípicas observadas en términos de tropismo tisular, virulencia y éxito ecológico, se cree que está dirigido por un pequeño número de rasgos genéticos. Por lo que hay todavía una falta de conocimiento de los factores moleculares implicados en la patogenidad de chlamydia (298). Atendiendo a esta conservada disposición cromosómica, decidimos realizar un árbol filogenético basado en la secuencia concatenada de los genes pertenecientes al genoma mínimo bacteriano (361), con el fin de conocer lo más exactamente posible la historia evolutiva de esta especie bacteriana.



**Figura 35.** Árbol filogenético concatenado de los 234 genes del genoma mínimo, realizado en este estudio.

Sorprendentemente, pero coincidiendo con otros trabajos evolutivos muy recientes de CT (298), se pueden establecer 4 grandes linajes (LGV, los genotipos E/F, genotipos A-C y genotipos D-K). Según este análisis, LGV fue el primer linaje que se separó del resto, previa a la separación entre cepas urogenitales no invasivas (E/F) y oculares (A-C), probablemente las más recientes en aparecer. Ahora bien si se pueden establecer sin dificultad 4 linajes y solamente se describen 3 patotipos, sugeriría un proceso de evolución convergente entre las cepas urogenitales no-invasivas E/F y D-K, o bien que una de ellas adquirió un rasgo genético que le permitió conferir una clínica similar al presentado por el otro linaje. Para comprobar esta hipótesis analizamos nuevamente los genes de genoma mínimo empleados en la reconstrucción del árbol filogenético mostrado en figura 35, pero de manera individualizada. Los resultados obtenidos fueron:



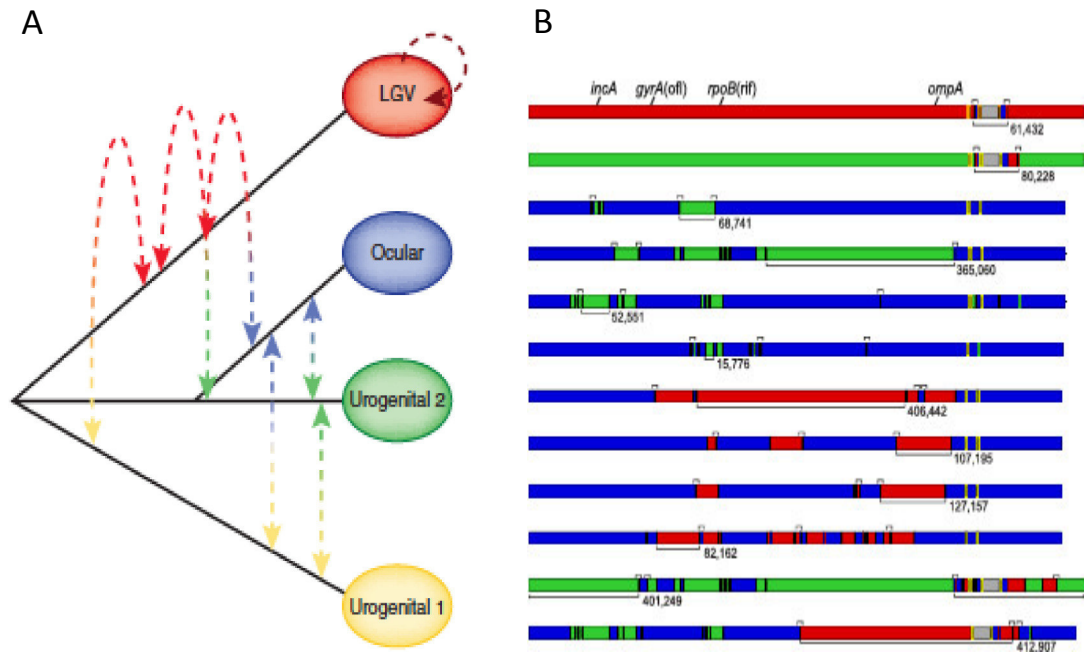
**Figura 36.** Reconstrucción filogenética basada en la topología del árbol de la figura 35, pero donde cada rectángulo representa un gen del genoma mínimo. Los colores identifican la asignación a diferentes linajes. Rojo a LGV; Verde a genotipo E/F; Negro a tracoma+ genotipos D-K; Azul claro específico de los genotipos urogenitales no invasivos D\_K. Finalmente el amarillo representa genes muy conservados en todos los linajes.

De la figura 36 se deduce que existen 3 grandes patrones genéticos y un sublinaje que permite diferenciar entre tracoma y los genotipos D-K. Es de resaltar la presencia compartida de al menos 3 genes entre los genotipos urogenitales no-invasivo E/F y D-K que podrían estar implicados en los procesos de evolución convergente entre ambos patrones genéticos y comportamientos fenotípicos. Otro hallazgo importante de este análisis se observa en el patrón genético de la cepa denominada G1. Esta es la cepa recombinante entre LGV y G descrita en Seattle e idéntica a la descrita en nuestro estudio. Puede observarse un gen, además de *pmpH* que procede de LGV, sugiriendo que la recombinación entre ambas cepas puede ser el resultado de más de un evento de recombinación.

## 5. INFLUENCIA DE LA RECOMBINACIÓN Y LA MUTACIÓN EN LA EVOLUCIÓN DE *Chlamydia trachomatis*.

Como ya se ha indicado, la naturaleza intracelular de CT, el reducido tamaño de su genoma (~1Mb) y su particular ciclo vital, siempre habían hecho pensar que la recombinación era poco probable en este microorganismo. Sin embargo las primeras evidencias de eventos de recombinación se sugirieron en el gen *ompA* por análisis de las secuencias nucleotídicas (390). Diez años después fue confirmada la recombinación en este gen, pero también en regiones implicadas en la adhesión como *pmpC* (310). Posteriormente las regiones adyacentes de *ompA* y otros genes implicados en virulencia se identificaron como sitios calientes de recombinación (343). En los últimos años se ha comprobado que *Chlamydia* cuenta con toda la maquinaria necesaria para la recombinación (391) y que esta podría ser más frecuente de lo que previamente se sospechaba (392).

La primera evidencia de un gran reordenamiento genómico, se describió en 2011, en un aislado clínico de un paciente con proctitis hemorrágica severa. La secuenciación del genoma completo, reveló que ese aislado era una cepa única resultante de un evento de recombinación de 78 Kb entre una cepa de LGV-L2 y una cepa del genotipo D (250). Un año más tarde, la secuenciación de 52 genomas completos de *Chlamydia* y el análisis de genómica comparada han revelado una tasa de recombinación inimaginable para esta especie (54). Estos y otros autores afirman que la recombinación puede ocurrir a lo largo del genoma y que puede comprometer hasta 25% del cromosoma, revelando su importante papel en su evolución (54, 301); si bien hay 6 regiones del cromosoma que presentan una mayor frecuencia de recombinación (54). Otro hallazgo importante de estos estudios de genómica comparada es que todos los genotipos de cada patotipos (LGV, tracoma y urogenital no invasiva) pueden intercambiar material genético, sugiriendo que no existe ninguna barrera genética para la recombinación entre todos los miembros de CT (figura 37a).



**Figura 37.** A) Representación filogenética de los genotipos de cada patotipo descritos en *C. trachomatis*, basados en el análisis de genomas completos. Obsérvese que los genotipos urogenitales no invasivos llegan a diferenciarse en 2 ramas diferentes: Urogenital 1 (genotipos E y F) y urogenital 2 (genotipos D/G/Ia y J) más relacionados evolutivamente con tracoma (54). Las flechas discontinuas muestran los inferidos eventos de recombinación. B) Recombinantes de *C. trachomatis* obtenidos, en condiciones de laboratorio después de pases seriados en presencia de antibiótico, cuando crecen conjuntamente >1 genotipo en el mismo cultivo (276)

Por otro lado, estudios realizados, en condiciones de laboratorio (276), permitieron confirmar la facilidad que tiene CT, en condiciones de coinfección, para generar formas recombinantes después de 48h bajo selección antibiótica (figura 37b). En este mismo estudio, se secuenció el genoma completo de 12 recombinantes de laboratorio. Nueve recombinantes presentaron una mayor eficiencia de unión a la célula eucariota que sus cepas parentales (L2 y J o F). Todos ellos tenían genes recombinantes en las proteínas TarP o Pmp (como *pmpH*, *pmpG*, *pmpF*, *pmpE*), revelando el papel que estas proteínas tienen en virulencia.

Si bien se ha comentado en este apartado la nueva visión que la era genómica ha aportado a la comprensión de la historia evolutiva de CT, no debemos olvidar que entre las dos principales fuerzas que contribuyen a la generación de variabilidad: mutación y recombinación, varios estudios coinciden que en condiciones naturales la mutación ocurre 70 veces más frecuentemente que la recombinación, aunque la recombinación tenga un efecto más importante en la diversificación (58, 382)



A pesar de esto, muchas de estas mutaciones puntuales son homoplásicas (26%), es decir, se encuentran en las mismas regiones cromosómicas en aislados pertenecientes a clados filogenéticos diferenciados entre sí (346). Estas mutaciones pueden aparecer por azar como resultado de la presión selectiva que hace que queden fijadas en la población, sin embargo el elevado porcentaje de cambios homoplásicos detectados en CT hace pensar que grupos de mutaciones puntuales también podrían sean transferidos conjuntamente, en bloques, entre unos aislados y otros por recombinación homóloga (54).

## 6. PROPUESTA DE GENES QUE DEFINAN LOS EVENTOS DE MACRO- Y MICRO-EVOLUCIÓN

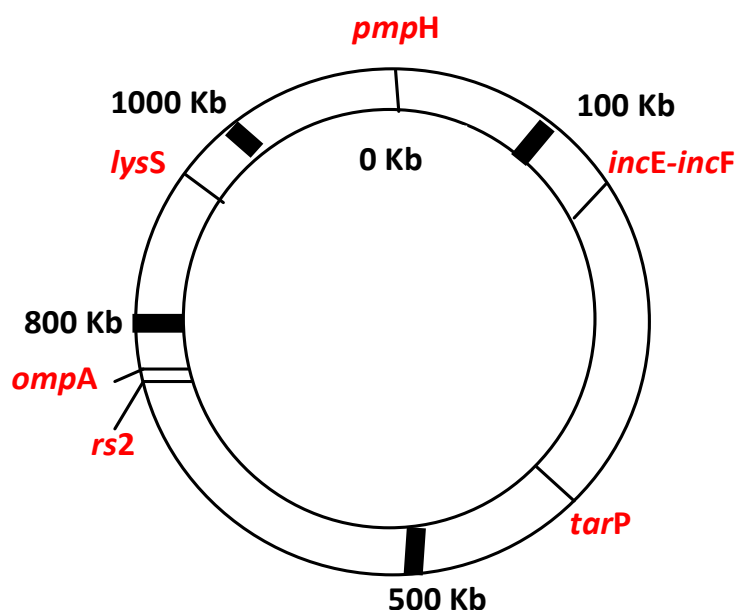
En el campo de las enfermedades infecciosas el conocimiento de la epidemiología molecular de las cepas es importante porque permite identificar patrones de transmisión y grupos vulnerables de lo que se pueden concluir medidas preventivas. También permite identificar brotes epidémicos y la instauración de sistemas de vigilancia de clones específicos, así como diferenciar entre persistencia e infección nueva. Sin embargo un esquema de MLST, similar al de otras bacterias, aunque propuesto por algunos investigadores (360, 393, 394) no ha sido adoptado por la comunidad científica, dificultando la comparación entre estudios (298), si bien solo recientemente ha sido publicado una nueva propuesta de MLST basado en estudio coordinado de 16 países que podría llegar a tener un mayor nivel de aceptación (395)

Históricamente, la caracterización de CT se ha basado en el serotipado con anticuerpos específicos frente a dominios específicos de la proteína MOMP (codificada por el gen *ompA*). Por ello, con el comienzo de la era molecular, se generalizaron los ensayos basados en PCR que usaban como referente epidemiológico el gen *ompA*. (294, 396). Sin embargo las técnicas genómicas han revelado la escasa relación entre el genotipo de *ompA* y los patotipos clásicamente identificados en CT, además la gran cantidad de estudios epidemiológicos basados en este gen han revelado que se trata de un gen bajo fuerte presión selectiva en respuesta al sistema inmune, permitiendo una rápida evolución. De hecho un estudio analizando todas las variantes de *ompA* descritas a nivel mundial, reveló una fuerte tasa de mutación concentrada en los epítomos de reconocimiento de células B (239), confirmando, como variantes de un mismo genotipo pueden presentar rápidamente diferencias. Por ejemplo el 15% de todas las mutaciones descritas en el genoma completo de la variante L2b de LGV asociada al brote de linfogranuloma en Europa, se observan en el gen *ompA* (397). Este hecho

puede constituir una importante ventaja para estudios epidemiológicos a corto plazo, principalmente para el estudio de brotes o redes de transmisión por una misma variante (298). Por lo tanto cualquier estudio de epidemiología molecular sobre CT deberá incluir el gen *ompA*, que si bien no nos permite inferir los patotipos, nos permitirá identificar los eventos de evolución más recientes. Lo que se ha venido en llamar eventos de microevolución (398).

Por otra parte, consideramos importante que en la propuesta de genes candidatos que permitan inferir los procesos de macro y microevolución sean incluidos genes implicados en la adaptación específica de nicho o patoadaptación. Para seleccionar entre los genes ya descritos en la bibliografía (55, 300, 399) y ampliamente presentados a lo largo de esta Tesis, el análisis recientemente descrito por Borges *et al.* sobre la dinámica de adaptación de las cepas relacionadas con el brote de linfogranuloma en Europa puede ser un buen modelo (397). En este trabajo se analiza el genoma completo de cepas de LGV pertenecientes al genotipo L2b a lo largo del brote epidémico para establecer aquellos genes implicados en patoadaptación más sensibles a la acumulación de cambios no sinónimos. Varios tipos de genes acumulan 5 veces más cambios no sinónimos que cambios sinónimos sugiriendo una fuerte implicación en la adaptación. Entre ellos CT049, CT082, CT119/*incA*, CT223, CT233/*incC*, CT333/*uvrA*, CT442/*crpA*, CT456/*tarp*, CT711, CT868, CT875/*tepP*, CT413/*pmpB*, CT414/*pmpC*, CT871/*pmpG* and CT872/*pmpH*. Algunos de estos genes han sido ampliamente descritos, como los efectores del sistema de secreción tipo III (*TarP*, *TepP*), o bien los genes *inc*, implicados en la invasión celular. Entre los genes codificantes de las proteínas Pmps, tan solo CT413/*pmpB*, CT414/*pmpC* y CT872/*pmpH*, muestran también acumulación de mutaciones específicas de cepas, lo que permite inferir que la selección de uno de estos genes podría aportar mayor poder discriminatorio dentro de un estudio de epidemiología molecular. Por ello proponemos, basado en este análisis seleccionar (por su mayor evidencia) para incluir en nuestra propuesta, los genes *TarP*, *IncE-F* y *pmpH*

Finalmente, para definir los eventos de macroevolución, es decir los procesos adaptativos más lentos de fijarse en la población y que representan la reconstrucción de los grandes linajes o trayectorias evolutivas de CT, proponemos basar la aproximación en genes descritos para la asignación del esquema de MLST. Siguiendo el esquema mas citado de MLST (400), 7 genes fueron propuestos: *glyA*, *mdhC*, *pdhA*, *yhbG*, *pykF*, *lysS* y *leuS*. Entre estos genes seleccionamos *lysS* por su posición en el genoma. De esta manera se elegían genes a lo largo de todo el cromosoma (figura 38)



**Figura 38.** Disposición de los genes propuestos para la realización de estudios de epidemiología molecular a lo largo del cromosoma bacteriano de *C. trachomatis*

Por tanto nuestra propuesta se basa en la selección de tres categorías de genes. Aquellos implicados en procesos de macroevolución (*lysS* y *rs2*), microevolución (*ompA*) y patoadaptación (*TarP*, *incE-F* y *pmpH*).

## 7. APLICACIÓN DEL MODELO PROPUESTO A LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y EVOLUCIÓN FILOGENÉTICA DE LA VARIANTE DESCRITA EN EL CAPITULO ANTERIOR.

La descripción, y la continua detección posterior, de la cepa resultado de un evento de recombinación en el gen *pmpH*, dentro del estudio para cuantificar el porcentaje de coinfecciones por genotipos invasivos y no invasivos de CT, nos permitió aplicar el modelo propuesto (basado en la secuenciación de los genes *lysS*, *rs2*, *ompA*, *tarP*, *incE-F* y *pmpH*) en caracterizar la evolución a lo largo de varios años de esta variante en la población de Madrid (Este abordaje es una aproximación más limitada que el análisis de genomas completos, si bien ese análisis se escapa de las posibilidades de esta Tesis).

Los análisis filogenéticos de los genes individuales y de los concatenados nos permitirá tener una idea más aproximada sobre si la variante recombinante se originó hace

mucho tiempo o no (análisis de los genes implicados en macroevolución), así como una mayor evidencia de su relación filogenética con otros genotipos descritos. Por otro lado el análisis de los genes más susceptibles a la acumulación de cambios por recombinación y/o mutación (microevolución) nos permitirán evidenciar con mayor precisión la evolución temporal que ocurra a medida que se dispersa en la población.

## **OBJETIVO-**

**Demostrar el éxito adaptativo de la variante recombinante encontrada en muestras clínicas.** Estudiar la evolución temporal de la variante recombinante indentificada, como evidencia del éxito adaptativo. Caracterización molecular de esta variante siguiendo un criterio de selección de genes desde el punto de vista de micro y macro-evolución.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### *1. Periodo de estudio y muestras estudiadas*

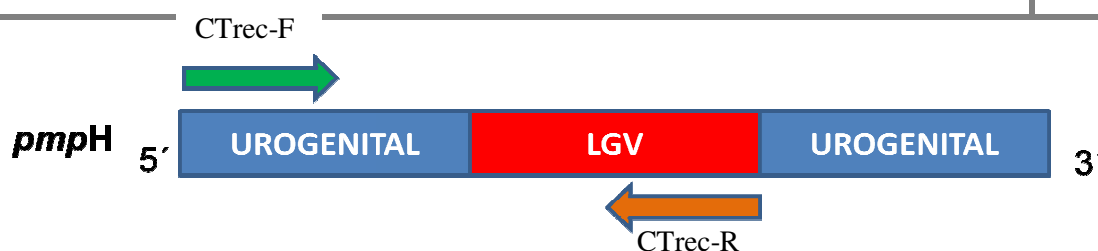
Se realizó un estudio retrospectivo para determinar el éxito adaptativo de la variante recombinante en el gen *pmpH*, descrita en el capítulo 2. Para ello se seleccionaron muestras con amplificación positiva para CT que procedían tanto del Centro Sanitario Sandoval como de la consulta de ITS del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Las muestras se dividieron en dos grupos:

- Grupo I: Correspondiente al período 2011-2013. En este grupo se estudiaron 135 muestras. Según la localización anatómica, 112 muestras correspondieron a exudados rectales, 9 exudados uretrales, 11 muestras de cérvix y 3 exudados faríngeos.
- Grupo II: En este grupo se incluyeron 274 muestras, seleccionadas de forma aleatoria a lo largo de 2014-2015. Según la localización anatómica, 75 muestras correspondieron a exudados rectales, 93 exudados uretrales, 68 muestras de cérvix y 38 exudados faríngeos.

### *2. Diseño de PCR para detección de la variante recombinante*

Basado en la secuencia del gen *pmpH* y aprovechando el evento de recombinación descrito en la nueva variante, se diseñó una PCR específica para detectar su presencia en las muestras estudiadas. El esquema del diseño de esta PCR se refleja en la Figura 39. La secuencia de los cebadores empleados fue:

- CTrec-F: 5'-CATCGACTCCAACCTCCTCCA-3' (Ta: 62°C)
- CTrec-R: 5'-TTAACTGTAAAAGTCGTACTTGA-3' (Ta: 60°C)



**Figura 39.-** Diseño de PCR específica en base al evento de recombinación presente en la nueva variante recombinante. El cebador directo (verde) es complementario al fragmento de origen urogenital en el extremo 5' del gen *pmpH*. El cebador reverso (naranja) se complementa con el fragmento correspondiente a genotipos invasivos, insertado en la porción intermedia del gen *pmpH*.

Para la amplificación se realizó PCR convencional empleando la polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Norwalk, EEUU). El volumen final de reacción fue de 50 µL conteniendo tampón de reacción (10x),  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM), 0,6 mM de cada primer y 1,5 unidades de enzima. Las condiciones de amplificación fueron: 94°C/12' seguido de 40 ciclos de 94°C/30'' + 58°C/30'' + 72°C/30'' y una etapa final de 72°C/10'. La visualización de los productos amplificados se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 2% preteñidos con BrEt.

### 3. Amplificación y secuenciación de los genes *ompA* y *pmpH*

Para determinar la especificidad de la PCR específica para la cepa recombinante, así como para la caracterización del genotipo y posterior análisis filogenético, se secuenciaron los genes *ompA* y *pmpH* de acuerdo a los protocolos ya descrito en capítulo 1.

### 4. Amplificación y secuenciación de genes relacionados con tropismo/patogenia

La secuenciación del gen *pmpH* reveló la posible recombinación intragenómica en algunas cepas (ver análisis filogenético más adelante). Para confirmar el genotipo y patotipo resultante en estas cepas, se amplificaron y secuenciaron fragmentos de los genes *tarP* (732pb), *rs2* (492pb) y *incE-incF* (645pb) que corresponden a genes que se han descrito que correlacionan con el tropismo tisular (y por tanto con el patotipo). La secuencia de los cebadores utilizados figura en la tabla 11.

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')	Referencia
<i>rs2</i>	rs2-1	AGCGCTGCACCACGTTTCATCAACT	(343)
	rs2.2	CGCGCCCGTAGCTCAATGGTAGA	
<i>incE-F</i>	Inc-E/F <sub>F</sub>	ATGGAATGCGTTAAACAGTTAT	Este trabajo
	Inc-E/F <sub>R</sub>	TTTGCAATGCAAAACATAACACC	
<i>tarP</i>	CT456-Fm	ACGCAACAAATTCAGCGGCTA	Modificado de (302)
	CT456-RSeq1	GAACAGACTTGGTCCCAATTT	
<i>pmpH</i>	pmpH <sub>F</sub>	AAACCGTGAGTATTTCCGGA	Este trabajo
	pmpH <sub>R</sub>	ATATGCCTCCTTCATTGTCTT	

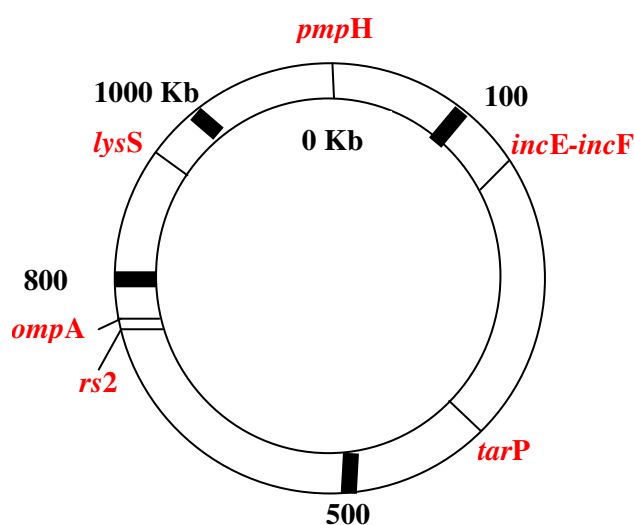
**Tabla 11.-** Cebadores diseñados para amplificación y secuenciación de genes relacionados con el patotipo

Para la amplificación se realizó PCR convencional empleando la polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Norwalk, EEUU) en un volumen final de 50microL conteniendo tampón de reacción (10x), Cl<sub>2</sub>Mg (1,5nM), dNTPs (0.2nM), 0,6 las siguientes: 94°C/12' seguidos de 40 ciclos de 94°C/30''+ T<sup>a</sup>/60''+72°C/ 90'' y una etapa final de 71°C durante 10'' (\*T<sup>a</sup>. Temperatura de hibridación, diferente para cada gen que se quiere amplificar. 57° C para *incE-IncF* y 60° C para *tarP* y *rs2*). La visualización de los productos amplificados se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% preteñidos con BrEt. El producto amplificado se purificó empleando ExoSAP-IT *purification kit* (USB Corp., Cleveland, OH, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante, y posteriormente se secuenciaron con el sistema automático, ABI 3100 Avant (PE Norwalk, CONN, EEUU).

Las secuencias nucleotídicas de los genes codificantes para las proteínas de membrana *ompA* y *pmpH* permiten la identificación de los genotipos relacionados con nuestra variante recombinante. Como ya se ha descrito previamente en esta tesis, no existe correlación entre la caracterización de genotipos, basada en la secuencia de *ompA* y el tropismo tisular o la patogenia. Para una mejor caracterización molecular se secuenciaron fragmentos de los genes *rs2* (492pb), *tarP* (732pb) e *incE-incF* (645pb) siguiendo el mismo protocolo descrito en el capítulo 2. Estos genes presentan buen poder discriminatorio y se han relacionado respectivamente con zonas calientes de recombinación, una elevada acumulación de inserciones/deleciones y elevada frecuencia de mutaciones, representando por tanto los tres



principales mecanismos que dirigen la evolución de CT. La distribución de estos genes a lo largo del cromosoma se describe en la figura 40.



**Figura 40.-** Esquema de la localización cromosómica de los genes estudiados. Los genes estudiados se distribuyen a lo largo de todo el cromosoma de CT.

Por último, se amplificó y secuenció un fragmento del gen *lysS* (610 pb). Al contrario que los genes anteriores, sometidos a mayor variabilidad, *lysS* presenta una secuencia nucleotídica conservada, siendo uno de los genes incluidos en el esquema de MLST del Orden *Chlamydiales* descrito por Dean *D y cols.* (394). La naturaleza conservada de este gen nos permitirá establecer la relación ancestral de nuestra variante recombinante con respecto al resto de genotipos.

Los cebadores para la amplificación de *lysS* fueron:

- *lys*-F: 5'- GAAGGAATCGATAGAACGCATAAT-3' (Ta: 66°C)
- *lys*-R: 5'- ATACGCCGCATAACAGGGAAAAAC-3' (Ta: 70°C)

Para la amplificación se realizó PCR convencional empleando la polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Norwalk, EEUU). El volumen final de reacción fue de 50µL conteniendo tampón de reacción (10x), Cl<sub>2</sub>Mg (1,5mM), dNTPs (0,2mM), 0,6 mM de cada primer y 1,5 unidades de enzima. Las condiciones de amplificación fueron 94°C 12minutoa seguido de 40 ciclos de 94°C 30 segundos, 62°C 1 minuto y 72°C 1 minuto, seguido de 10 minutos a 72°C. La visualización de los productos amplificados se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% preteñidos con BrEt.

## 5. Análisis filogenético

Las secuencias nucleotídicas fueron alineadas empleando el software ClustalW, implementado en el programa MEGA, y posteriormente editadas para descartar errores de secuenciación o alineamiento. Las secuencias se compararon con secuencias de todos los genotipos de CT existentes en bases de datos públicas ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

El modelo de sustitución nucleotídica elegido para cada gen fue seleccionado con el software jModeltest 1.0 (Posada D, 2008) basado en el criterio de información de Akaike. Se eligió el modelo GTR+I para el gen *rs2*, HKY+I para *incE-incF* y HKY para *tarP*, *pmpH* y *lysS*. Para la filogenia datada se empleó el método bayesiano de cadenas de Markov (MCMC) implementado en el programa BEAST v1.5.74. En el caso de genes no recombinantes se realizó un concatenado y la fecha empleada para cada secuencia fue el año de aislamiento.

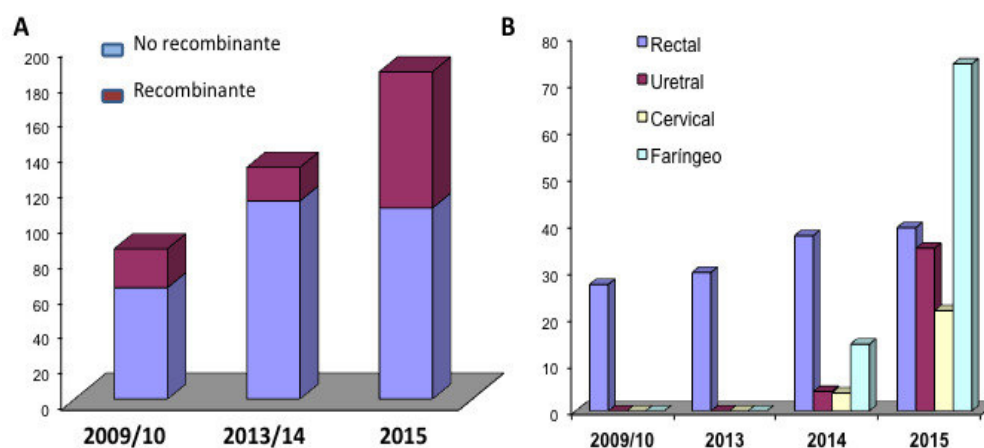
Se empleo un reloj molecular relajado con una distribución log normal. El método MCMC se aplicó por duplicado para 200 millones de generaciones, muestreando cada 20.000 y desechando un 10%. El resultado del análisis se analizó con el programa TRACER v1.5, aceptando un tamaño de muestra efectivo mayor de 200 para establecer la convergencia. El árbol consenso, aceptando una probabilidad posterior por clado mayor de 0,5, se generó empleando TreeAnnotator.

## **RESULTADOS**

### *1. Distribución espacio-temporal de la variante recombinante a lo largo del período de estudio.*

Como se describe en el capítulo 2, durante el periodo 2010-2013 se encontró la variante recombinante en el gen *pmpH* en el 27,6% de las muestras estudiadas correspondiendo en todos los casos a muestras procedentes de exudados rectales. De forma global, el porcentaje de detección de esta variante aumenta hasta un 38,6% en el periodo 2014-2015 (figura 41-A).

Analizando la misma evolución temporal, por tipos de muestra, podemos observar como hasta el año 2013, esta variante sólo se encontró en muestras rectales, representando el 29,2% del total de muestras estudiadas. El porcentaje de detección en esta localización alcanza un 39% durante el primer semestre de 2015. Los primeros casos de detección de la variante recombinante en localización no rectal se detectan en el año 2014, en muestras uretrales, faríngeas y cervicales, alcanzando un porcentaje de detección de 34,7%, 74.2% y 21,4% respectivamente, durante el primer semestre de 2015 (figura 41-B)



**Figura 41.-** A) Evolución temporal de la proporción encontrada de la variante recombinante en el total de muestras analizadas B) Porcentaje, por tipo de muestra, de la variante recombinante encontrada respecto al total de muestras analizadas.

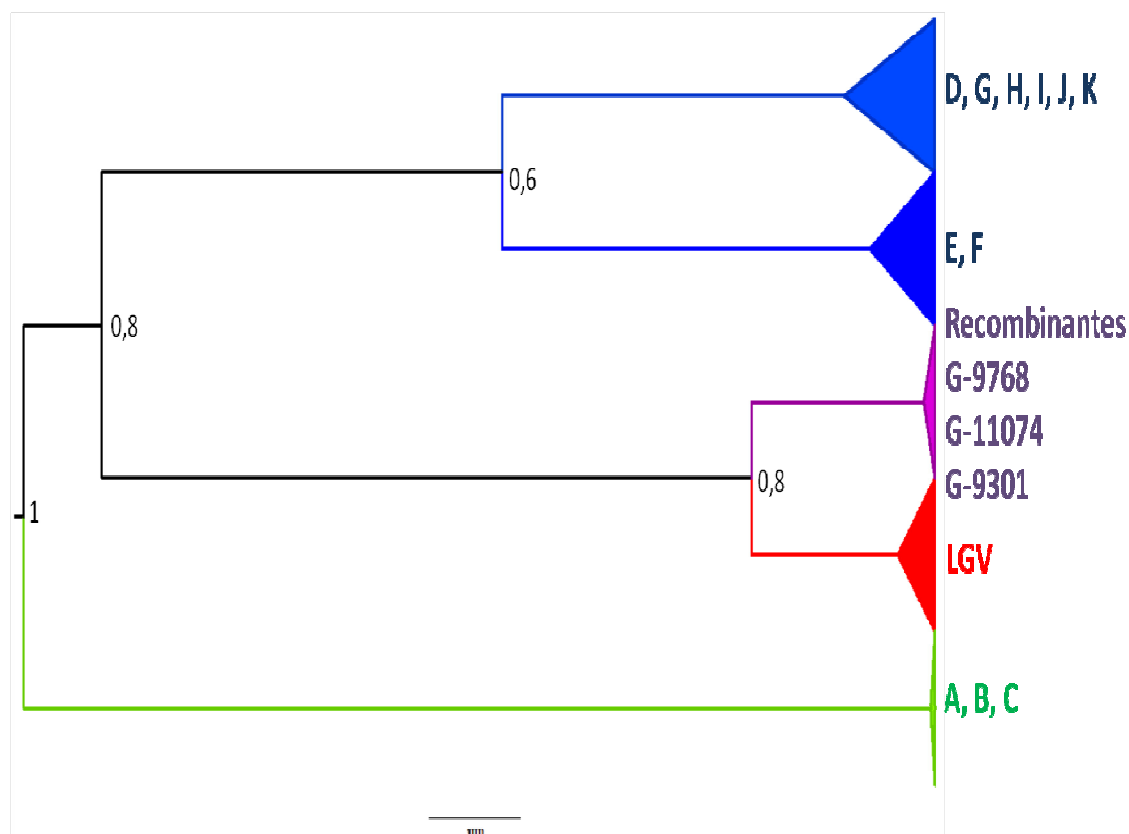
En cuanto al comportamiento sexual de los pacientes en los que se detecta la variante recombinante, hasta el años 2013, que todas las muestras eran rectales, todos los pacientes eran HSH (dos de ellos eran bisexuales). A partir de 2014, se observa una dispersión de la cepa en las muestras de origen uretral, de estas 15 de 26 individuos (53,8%), corresponden a pacientes HSH, mientras que 9/26 (34,6%) se declaran heterosexuales y 2 pacientes

bisexuales (7,7%). En las muestras de origen faríngeo, 22 de 24 casos fueron HSH (91.6%), los otros dos casos correspondieron a una trabajadora del sexo y un varón heterosexual. Por otro lado, en este segundo periodo 2 de las 29 muestras rectales (6,9%) en las que se detectó el recombinante, correspondieron a individuos bisexuales.

En relación a la presencia o ausencia de síntomas, la mayoría de los casos fueron asintomáticos o se pudo atribuir a la presencia simultánea de otra bacteria de transmisión sexual, a excepción de las muestras de cérvix, donde el 77,7% (7/9) de los pacientes presentaron sintomatología no atribuible a otras causas. El 95,8% (23/24), 71.2% (42/59) y 57,7% (15/26) de los pacientes que presentaban la cepa recombinante en faringe, recto o uretra, respectivamente, fueron asintomáticos. En 4/11 (36.3%) de los casos sintomáticos de localización uretral, y en 6/17 (35.3%) de los que tenían muestras rectales, presentaban coinfección por *N. gonorrhoeae*.

## *2. Evolución genómica de la cepa recombinante detectada en Madrid a lo largo del período de estudio.*

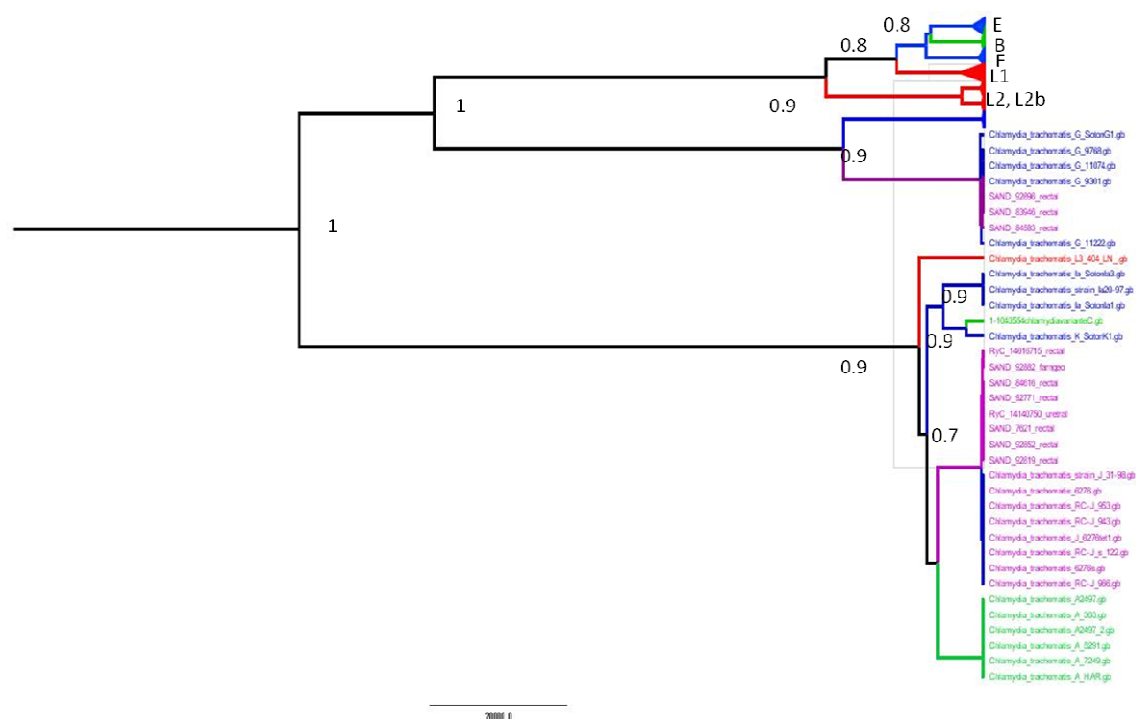
En el capítulo 2 de esta Tesis, se argumentaba en la discusión, que la acumulación de cambios nucleotídicos entre las cepas de Seattle y las detectadas en Madrid, sugería una transmisión mantenida en el tiempo de estas cepas, ya que cada evento de transmisión (nueva infección) supone un cuello de botella evolutivo. En orden de confirmar nuestra hipótesis decidimos secuenciar cepas recombinantes mas separadas en el tiempo. Las relaciones filogenéticas, en base a la secuencia del gen-*pmpH* (gen que determina el genotipo recombinante), revelan una identidad de secuencia en la figura 42. Se mantiene la relación filogenética con las variantes de genotipo G descritas en Seattle al igual que con las secuencias obtenidas en el periodo 2011-2013, manteniendo un 100% de identidad de secuencia.



**Figura 42.-** Análisis filogenético obtenido por el método BEAST del gen *pmpH* (404 pb). Los colores indican los distintos clados asociados con el pa totipo de *C. trachomatis* (azules: urogenital no invasivo, verde: ocular, rojo: invasivo y morado: muestras con amplificación positiva para la PCR específica del recombinante junto con las secuencias de referencia del genotipo G descritas en Seattle (G-9768; G-9301 y G-11074) y los recombinantes detectados en el periodo 2010-2013).

Siguiendo el esquema propuesto en el capítulo 1 y 2 de esta Tesis, a continuación se secuenció el gen *ompA* y se establecieron las relaciones filogenéticas. Mientras que las 23 secuencias de la variante recombinante caracterizadas en el período 2011-2013, estaban asociadas al genotipo G, solo 3/11 secuencias caracterizadas durante 2014, se agruparon con los genotipos G. Sorprendentemente, 8 nuevas secuencias del período 2014, incluidas las correspondientes a las muestras uretral y faríngea, se agruparon con soporte estadístico con secuencias pertenecientes al genotipo J (Figura 43). Este hallazgo no esperado, podría ser explicado por dos situaciones diferentes, i) Se trata de un nuevo evento de recombinación que puede haber afectado al gen recombinante en *pmpH* (generación de una nueva variante por adquisición del gen *pmpH* recombinante en una cepa del genotipo J, resultado de un único evento de recombinación) o en el gen *ompA* (respondiendo a un segundo evento de recombinación en la cepa conocida). Esta opción estaría favorecida por la elevada frecuencia de coinfecciones por distintos genotipos en una misma localización anatómica (como se describe en capítulo 2), o ii) una nueva entrada en nuestra población de una nueva variante no

previamente identificada. Esta opción estaría avalada por el cambio epidemiológico que se observa desde 2014 (identificación del genotipo recombinante en muestras extra-rectales, y no asociada exclusivamente a HSH)



**Figura 43.** Análisis filogenético por el método BEAST del gen *ompA* (1124 pb). El color morado corresponde a las secuencias de la variante recombinante obtenidas a lo largo del año 2014. En azul indican los genotipos urogenitales no invasivos, en rojo los genotipos invasivos asociados a LGV y en verde los genotipos oculares.

### 3. Análisis filogenético de genes relacionados con tropismo/patogenia

#### 3.1 Posible origen evolutivo de genotipo recombinante detectado en Madrid.

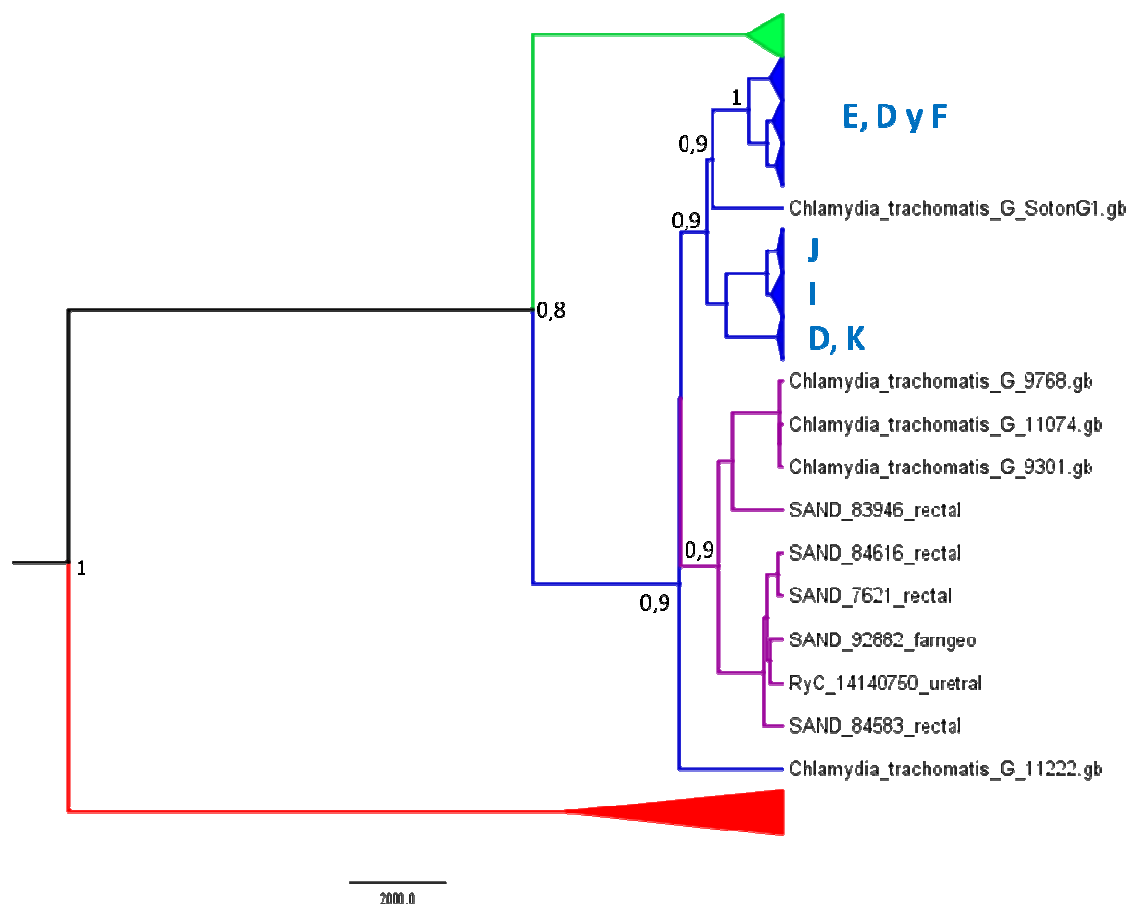
Siguiendo el esquema propuesto en la introducción al capítulo 3, referente a los genes que mejor podrían ayudar a comprender la dinámica de dispersión y evolución de las cepas de CT, los genes *incE-F*, *tarP*, *rs2* y *lysS* fueron secuenciados además de los ya descritos *pmpH* y *ompA* en cepas descritas en 2014.

En nuestro caso, los genes *rs2* y *lysS*, codifican para proteínas altamente conservados en la especie CT (proteína ribosomal S2 y tRNA respectivamente). Esta característica, nos permitirá establecer la relación ancestral de nuestra variante con el resto de genotipos.

El árbol obtenido con secuencias del gen *rs2* permite diferenciar las cepas de LGV y los genotipos D, E y F. Las cepas recombinantes encontradas en este trabajo se agrupan junto con el resto de los genotipos, es decir genotipos oculares (A-C) y los genotipos urogenitales (G-K) (Figura S2c-Anexo-IV). Similar resultado se observa con el árbol filogenético del gen *lysS* que permite diferenciar genotipos oculares (A-C), donde se agrupan las cepas recombinantes de este trabajo, del resto de genotipos. La combinación de estos 2 árboles sugeriría que las cepas recombinantes de este trabajo tienen un ancestro común más próximo con los genotipos oculares (basado solo en dos genes).

El análisis de las secuencias de genes más relacionados con la invasión celular (*incE-F*) y patogenicidad (*TarP*), permite inferir *a priori* que se puedan diferenciar con soporte estadístico los genotipos LGV. El árbol filogenético de las secuencias de los genes *incE-incF* permite separar con soporte estadístico los genotipos invasivos (LGV), del resto de genotipos de CT (Figura S2a-Anexo\_IV). Las cepas de nuestro estudio no estarían relacionadas con cepas invasivas (LGV), coincidiendo con el análisis de los árboles de *rs2* y *lysS*. En el gen *tarP* (las diferencias nucleotídicas estarían implicadas en la especialización celular de los distintos genotipos y por tanto podría establecerse una relación con la gravedad de la infección), el árbol obtenido permite diferenciar con soporte los tres patotipos conocidos (LGV, ocular y urogenital no invasivo), las cepas recombinantes de nuestro estudio, aunque con bajo soporte pueden agruparse de forma independiente de los demás grupos, pero relacionadas con genotipos urogenitales no invasivos (Figura S2b-Anexo-IV).

Para contextualizar las diferencias observadas individualmente, se realizó un análisis filogenético del concatenado de 4 genes (además se incluyó el gen *pmpH* eliminando la región homóloga de LGV, para evitar artefactos en el nuevo árbol obtenido). Este análisis nos permitirá establecer las relaciones más ancestrales de esta variante. (Figura 44)

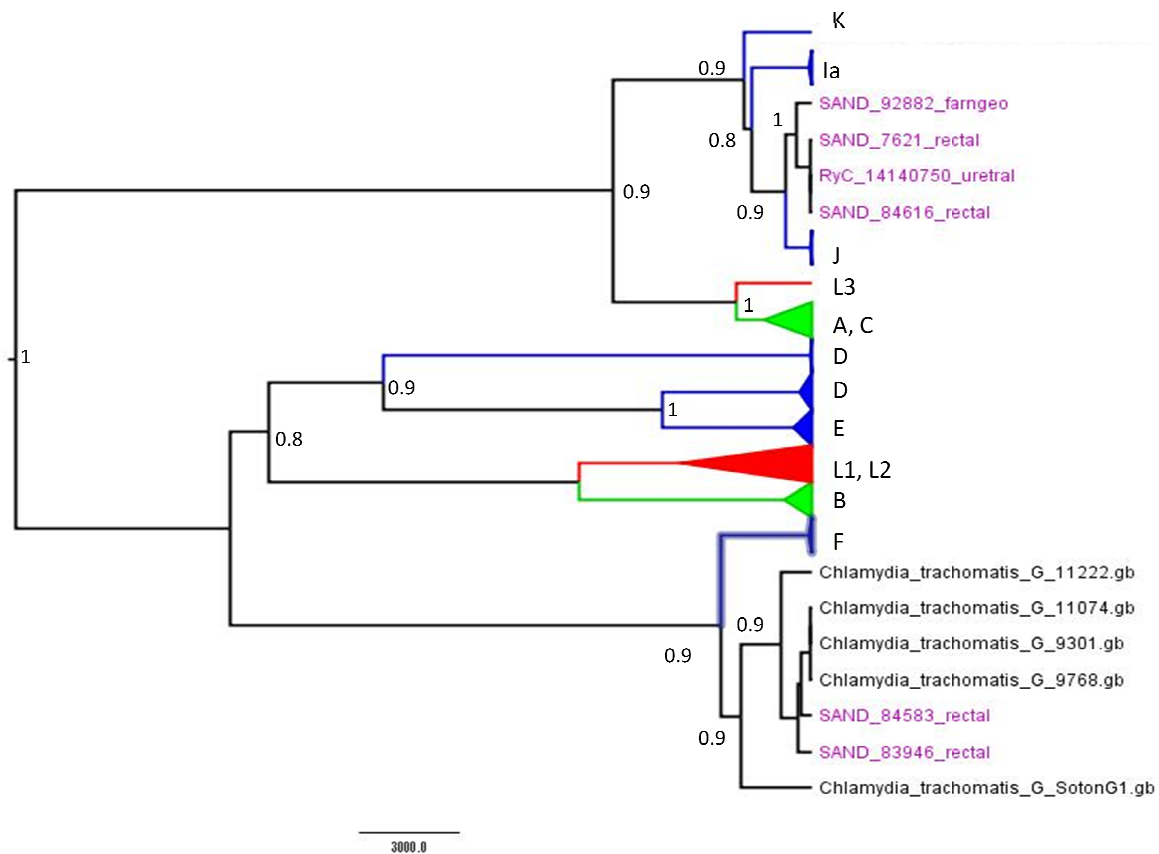


**Figura 44.** Análisis por el método BEAST del concatenado de genes (*incE-F*, *rs2*, *pmpH*, *tarP* y *lysS*). Se han eliminado la parte correspondiente a genotipo L de la secuencia de *pmpH*. Los colores de las ramas indican los distintos patotipos (rojo; LGV, verde; ocular, azul; urogenital y morado; recombinantes).

Como se observa en esta figura, el análisis filogenético de estos 5 genes reproduce la historia evolutiva de CT, como se ha descrito previamente. Las cepas de nuestro estudio (al igual que todas las cepas urogenitales no invasivas) están ancestralmente relacionadas con los genotipos oculares (como sugerían los árboles de *rs2* y *lysS*), pero la adición de genes relacionados con la invasión celular y patotipo, los relaciona más estrechamente a cepas urogenitales no invasivas, aunque claramente diferenciadas como sugería el árbol de *tarP*. Del árbol concatenado se infieren que existen dos linajes o trayectorias evolutivas dentro de las cepas del estudio (soporte estadístico de 0,9). Sorprendentemente la cepa SAND\_83946 aparecería en el origen del nodo de las cepas recombinantes descritas en Seattle 10 años antes (nodo Seattle), y SAND\_84583 como el origen del nodo exclusivamente de Madrid (aunque esta apreciación es menos evidente).



Repitiendo el análisis del concatenado de genes, pero incluyendo *ompA* y el gen completo de *pmpH* (Figura 45), podemos ver como nuestras secuencias, se diferencian claramente en 2 linajes bien diferenciados (debido a la presencia de un diferente gen en *ompA*, como ya había sido descrito). Lo sorprendente es que las dos cepas que portan el gen *ompA* asociado al genotipo G corresponden a las dos cepas que se identificaron en el árbol anterior como los posibles ancestros (de las secuencias conocidas) de los nodos de Seattle y Madrid respectivamente



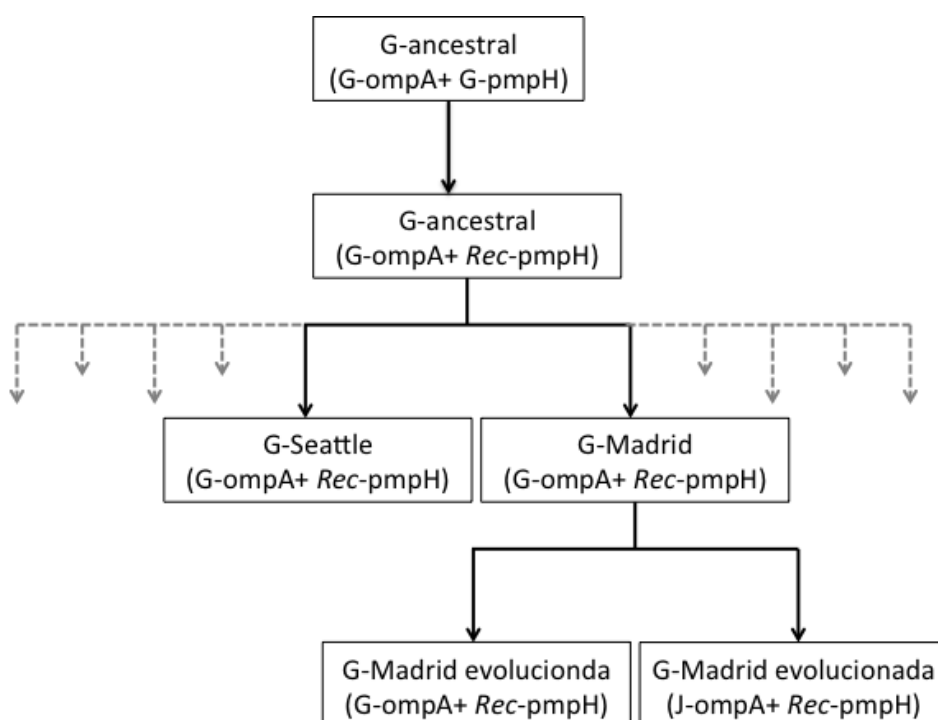
**Figura 45.** Análisis filogenético por el método BEAST del concatenado de todos los genes secuenciados (*ompA*, *incE-F*, *rs2*, *pmpH*, *tarP* y *lysS*). Los nombres en morado corresponden al concatenado de secuencias de la variante recombinante.

Este hallazgo permite especular que el gen *pmpH* recombinante ocurrió en una cepa con un gen *ompA* perteneciente al genotipo G y posteriormente evolucionó de manera diferente en 2 nodos (nodo Seattle y nodo Madrid) y posteriormente en uno de estos nodos (nodo Madrid) ocurrió un nuevo evento de recombinación que suponía el re-emplazamiento de *ompA* G-ancestral por *ompA* del genotipo J. Este resultado permite afirmar la hipótesis de la generación de un segundo recombinante en Madrid y que este nuevo recombinante se

transmite muy eficientemente (desplazando al recombinante que porta el gen *ompA* del genotipo G) no solo entre población de HSH sino también en población heterosexual.

## DISCUSIÓN

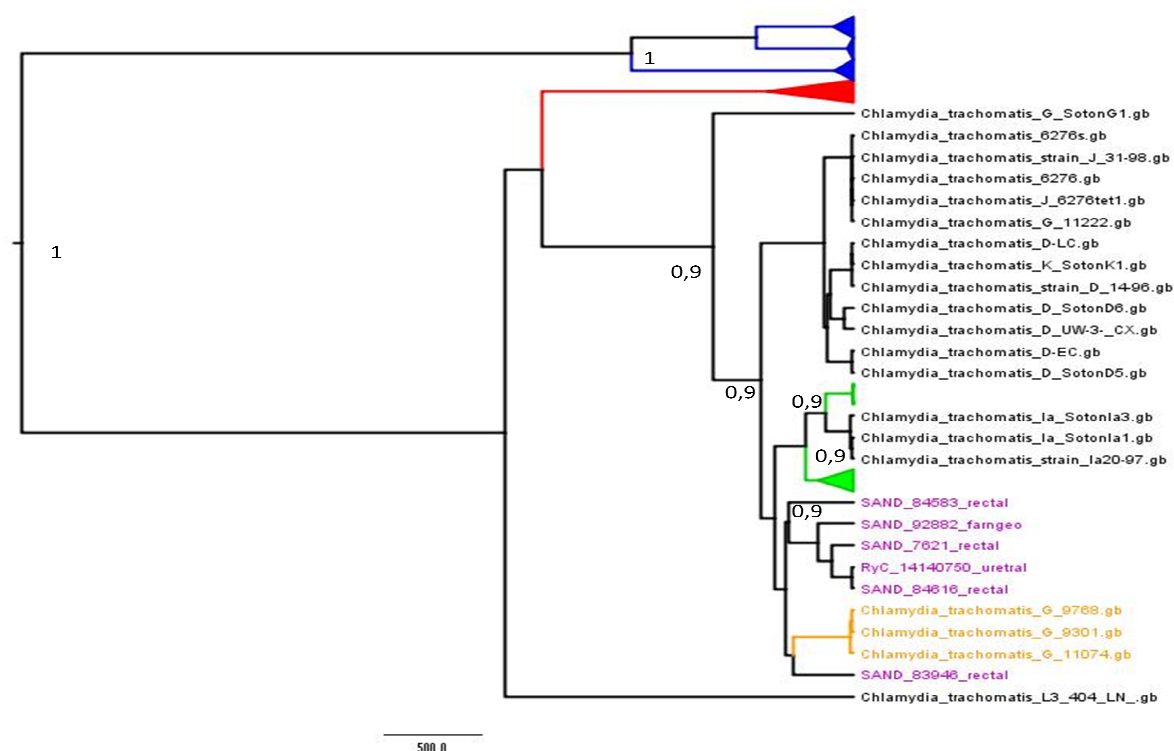
Los resultados presentados en este capítulo muestran en tiempo real, el reemplazamiento ecológico de una variante existente por una nueva variante emergente. En nuestro conocimiento, no existe ninguna referencia en la literatura que describa este fenómeno de reemplazamiento en tiempo real entre variantes de CT y que habría sido debido a un fenómeno de recombinación que afecta a un gen esencial en la adscripción a un determinado genotipo. Esta observación no solo permite especular la hipótesis evolutiva que se infiere de los resultados del apartado anterior, de que un único recombinante ancestral en *pmpH* (entre LGV y un miembro de CT no invasivo perteneciente al genotipo G), evolucionara al menos en dos trayectorias evolutivas diferentes (los denominados “nodo Seattle” y “nodo Madrid”, para facilitar su lectura), sino que posteriormente en alguna cepa del nodo Madrid (derivada de SAND\_84583 en nuestro muestreo), se produjera un segundo evento de recombinación que afectara al gen *ompA*, reemplazando el gen G-ompA por gen el J-ompA (Figura 46).



**Figura 46.** Representación esquemática de la hipótesis espacio-temporal de la diversificación de las cepas analizadas en este estudio. Las líneas discontinuas reflejan posibles dispersiones de la cepa ancestral.

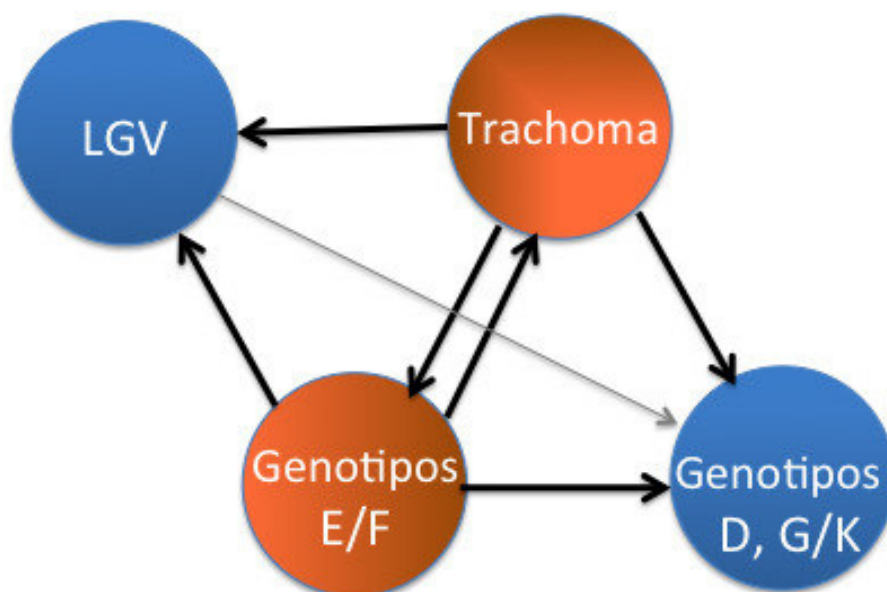
Además esta observación abre nuevas líneas de trabajo, plantea nuevos interrogantes y cuestiona algunas conclusiones previas. ¿Qué quiere decir que SAND\_83945, identificada en Madrid, este en el origen del nodo Seattle? A nuestro parecer, este puede resultar un muestreo

insuficiente. Como se ha demostrado en los diferentes árboles filogenéticos presentados en capítulo 3, la aparición del pmpH-recombinante es un proceso antiguo (según los árboles filogenéticos de los genes mas conservados *rs2* y *lysS*), sugiriendo que este variante puede haber tenido la oportunidad de una amplia dispersión; por lo que el hallazgo de variantes del nodo de Seattle y del nodo de Madrid, solo muestran la punta del iceberg de un fenómeno más disperso que lo encontrado hasta ahora.



**Figura 47.** Análisis filogenético del concatenado de los genes *rs2* y *lysS*. Los nombres en morado corresponden a las secuencias de nuestra variante.

Pese al alto grado de sintenia observado entre diferentes genotipos de CT, de los que disponemos información de genomas completos (54), la epidemiología de esta bacteria es más compleja de los que esos análisis permitían inferir. Si bien es conocido, solo reciente y sorprendentemente, la alta frecuencia de recombinación en esta bacteria, la transferencia genética entre miembros de esta especie, aparentemente, solo era evidente desde los genotipos de CT relacionados con tracoma (genotipos A-C) hacia los demás genotipos (LGV y genotipos D-K) y desde los genotipos E-F hacia los demás genotipos (LGV, genotipos A-C y genotipos D-K), mientras que transferencia desde LGV o genotipos D-K hacia otros genotipos parece mínimo (Figura 48) (ver Figura 36) (332).



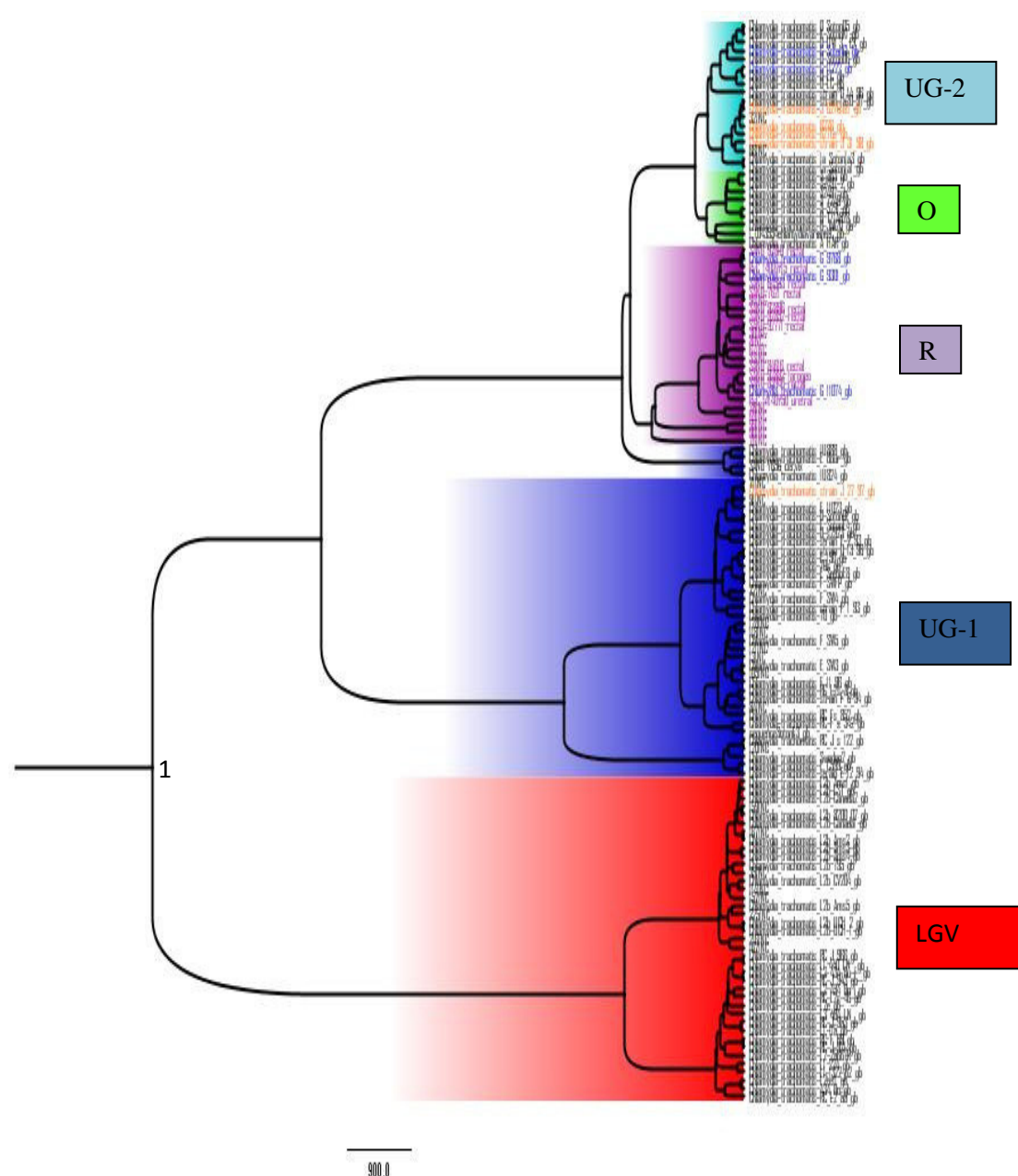
**Figura 48.** Representación esquemática de la transferencia de genes inferida del análisis de genomas completos de la figura 36.

Los resultados presentados en capítulo 2 y 3 de esta Tesis revelan que el intercambio de material genético entre LGV y miembros de los genotipos D, G-K) son más comunes que las inferencias iniciales. Esta observación evidencia la escasez de genomas completos secuenciados, pero también la rápida evolución ecológica que puede detectarse en esta especie bacteriana. En esta línea de evidencia puede presentarse la cepa G\_SotonG1 (NC\_020941). Inicialmente asignada como perteneciente al genotipo G (basado en el gen *ompA*), cuando el resto de su genoma es más próxima a cepas pertenecientes a los genotipos E y F (Similar observación se deduce en algunos miembros del genotipo D, que podrían haber recibido, por transferencia horizontal, genes procedentes de los genotipos E y F). Estas evidencias de transferencia genética referentes al gen *ompA* (empleado como gene clave para la asignación de genotipos), revelan el importante papel de este gen (*hotspot* de recombinación) para analizar los procesos de microevolución y dinámica de selección, como se proponía en la introducción de este capítulo.

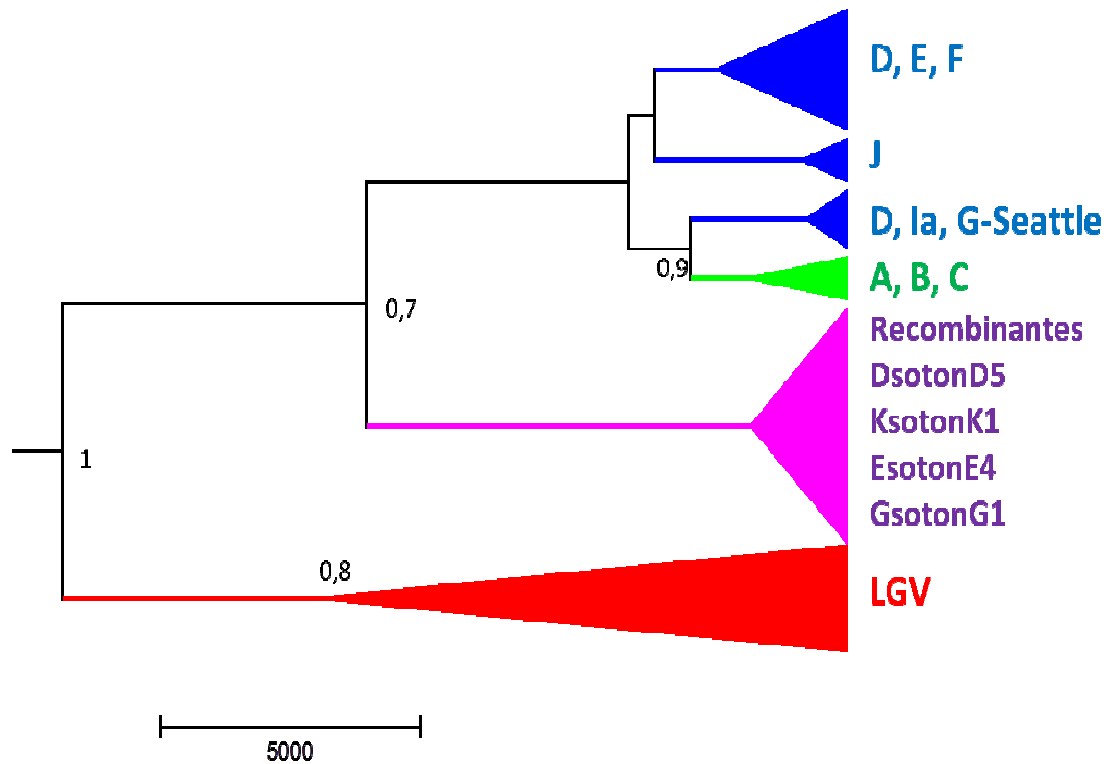
Otra cuestión interesante es que el reemplazamiento del gen G-*ompA* por el gen J-*ompA*, ocurre simultáneamente con un cambio epidemiológico referente a la población afectada. Si el variante G-*ompA* (con recombinación también en el gen *pmpH*) afectaba solo a población de HSH, la variante J-*ompA* (con recombinación también en el gen *pmpH*) afecta solo en 53% en muestras uretrales. Este reemplazamiento solo se observó en muestra extr-rectales. Entre la población no-HSH, detectamos un 11,5% identificada como población

punto (bisexuales y trabajadoras del sexo) y redes sexuales. El concepto de la población punto ya se presentó y discutió al comienzo de esta Tesis (ver Figura 1 de la introducción general), sobre la que la OMS habría impulsado un especial interés en su diagnóstico y seguimiento (11). Este trabajo sugiere el impacto de estas poblaciones en la transmisión de cepas entre grupos sexuales, amplificando su capacidad de dispersión en la población, como ya plantea la OMS y que fue presentado en la introducción general de esta Tesis (Figura 1).

Además de la implicación de las poblaciones punto en la dispersión de nuevas variantes en la población, el reemplazamiento del gen *G-ompA* por *J-ompA*, plantea dos interesantes cuestiones. En primer lugar, ¿por qué se observa un reemplazamiento por el genotipo J y no por otro más mayoritario?, ¿Tiene el genotipo G una mayor especialización para adherirse a células del recto, perdiendo capacidad de adherencia y transmisión por otras células que explique el desplazamiento por *J-ompA* en este contexto genético? O dicho de otra manera tiene *J-ompA* mayor tropismo celular cuando no se trata de células rectales? No tenemos, a día de hoy, respuestas a estas cuestiones pero si evidencian la necesidad de seguir trabajando en esta especie bacteriana.

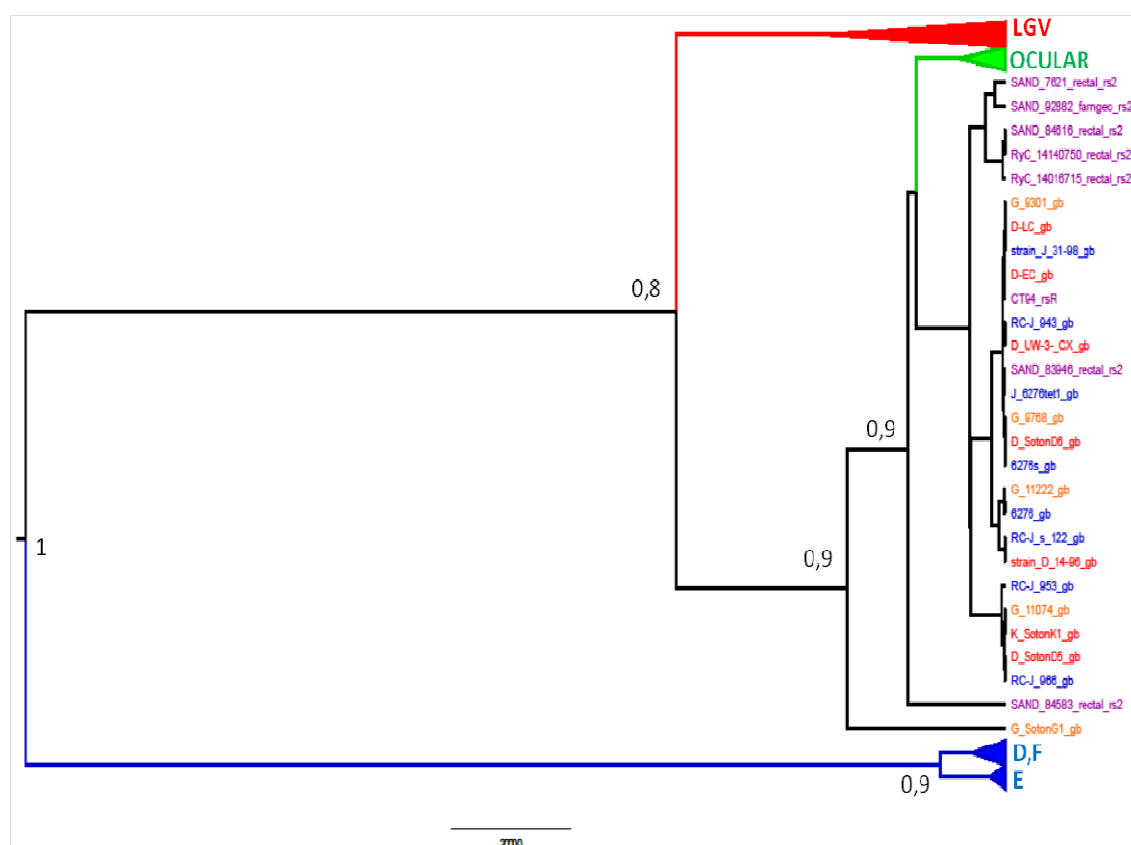
**ANEXO-V**

**Figura S2a.** Análisis filogenético por el método BEAST del segmento genético *incE-incF* (645 pb). Los colores agrupan los diferentes patotipos (azules: urogenital no invasivo, verde: ocular, rojo: invasivo y morado: muestras con amplificación positiva para la PCR recombinante). Los nombres de las secuencias en color azul corresponden a secuencias del genotipo G, en naranja las secuencias del genotipo J y en morado las secuencias de nuestro recombinante.

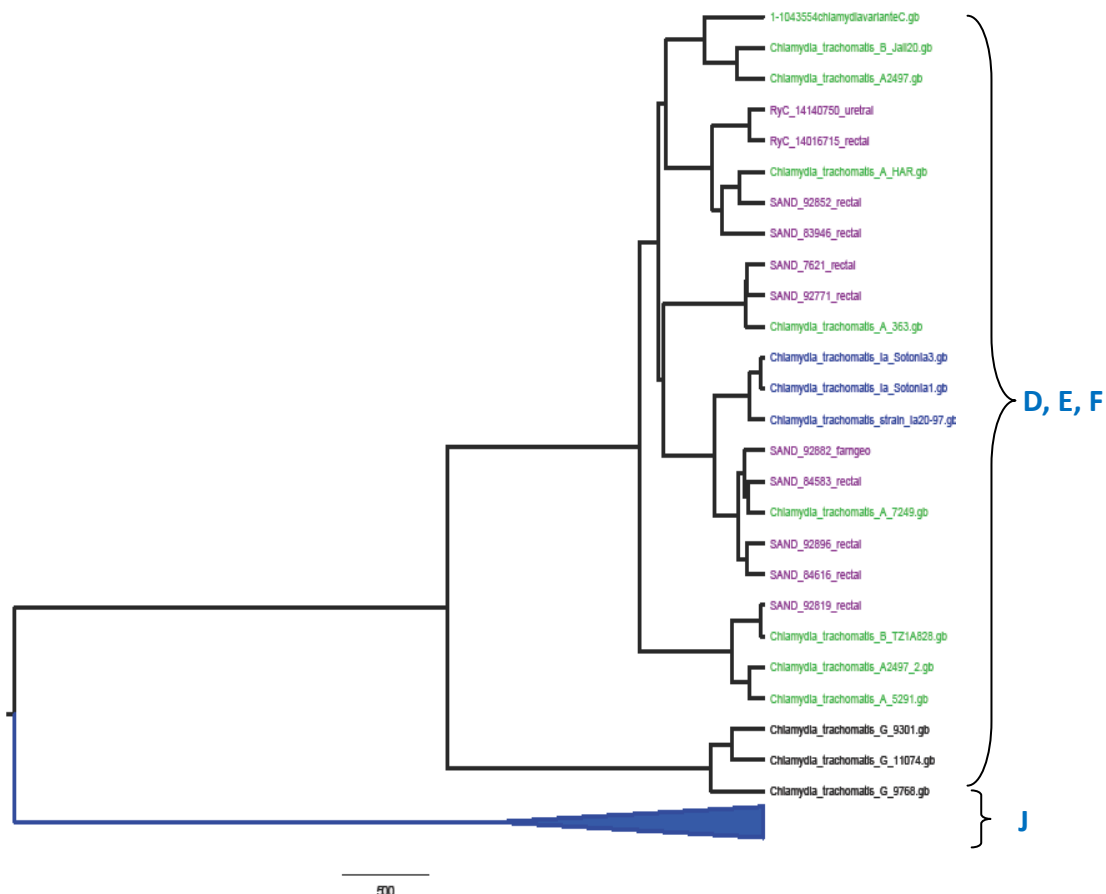


**Figura S2b.** Árbol filogenético obtenido por el método BEAST del gen *tarP* (732 pb). Los colores indican los tres patotipos de CT, azul: urogenital, verde: ocular y rojo: genotipos invasivos. El color morado corresponde a las secuencias de las variantes recombinantes de nuestro estudio con las secuencias de referencia con las que se agrupan. Se han colapsado las ramas sin soporte estadístico





**Figura S2c.** Análisis filogenético por el método BEAST del gen *rs2* (492 pb). Las ramas colapsadas corresponden a los genotipos urogenitales prevalentes D, E, y F (azul), oculares (verde) y genotipos invasivos (rojo). Los nombres en color morado corresponden a las secuencias recombinantes de nuestras muestras. Los nombres en rojo corresponden a secuencias de referencia del genotipo D, en azul al genotipo J y en naranja del genotipo G (incluidas las de Seattle).



**Figura S2d.** Árbol filogenético por el método BEAST del gen *lysS* (610 pb). El clado azul agrupa secuencias de todos los genotipos descritos de CT, excepto los genotipos oculares. Los nombres en morado corresponden a nuestras secuencias, en verde indica los genotipos oculares y en azul secuencias del genotipo Ia.

## **EPILOGO**

Comenzábamos esta Tesis con la intención de implementar herramientas diagnósticas para constatar la presencia de infecciones por genotipos asociados a linfogranuloma venéreo en nuestro entorno, apoyado en los datos epidemiológicos de varios países europeos y de la sospecha clínica de los especialistas en ITS de la Comunidad de Madrid. Este inicial objetivo no solo sirvió para poner a punto un sistema molecular de diagnóstico, también para confirmar la presencia y circulación genotipos asociados a LGV en Madrid. La demostración de casos que aumentaban cada año, indicaba que esta bacteria (no antes descrita en nuestro entorno) se transmitía de manera mantenida, en contra de la opinión de algunos autores que abogaban por una progresiva disminución en el número de casos y la rápida erradicación del brote. Iniciamos entonces, estudios de epidemiología molecular que mostraron interesantes particularidades como fue la descripción por primera vez, a nivel mundial, de que en Madrid, el brote de LGV no se asociaba exclusivamente a la circulación de una única variante: L2b, sino a la co-circulación de dos variantes: L2b y L2/L2f. En la discusión del capítulo 1 de esta Tesis se planteaba la posibilidad de que ambas variantes pudieran haber tenido diferentes vías de entrada (Sudamérica y Europa central). Si bien esta hipótesis no ha podido ser demostrada hasta la fecha, aplicando la aproximación filogenética con la información de secuencias disponibles, si marca un camino de futuras investigaciones. Lo que si pudimos comprobar, al comparar los dos cortes temporales, es que progresivamente la variante L2/L2f podría ir desplazando a la variante L2b debido a causar una sintomatología mas leve, lo que podría facilitar su transmisión. La evidencia de un incremento en el número de casos asintomáticos que podrían actuar como reservorio, junto con el incremento global del número de casos y la descripción cada vez mas frecuentemente en población heterosexual, ponen de manifiesto la necesidad de implementar en los laboratorios de Microbiología, el diagnóstico e identificación de los genotipos asociados a LGV, al menos, en individuos con prácticas de riesgo, tengan o no síntomas.

La descripción de casos asintomáticos de infección causada por genotipos de LGV, fue en si mismo una sorpresa, pues es una patología que siempre se asocia a adenopatías, proctitis... La posible circulación de variante de LGV con o sin síntomas junto con altas tasas poblacionales de infección por otros genotipos, donde si es bien conocido que hasta el 75% de las infecciones puede cursar de manera asintomática, planteaba la posibilidad, ante un nuevo escenario epidemiológico de la recombinación entre diferentes variantes, siempre que éstas puedan infectar simultáneamente una misma célula, ya que se ha comprobado la capacidad de

recombinación de esta bacteria en cultivos mixtos in vitro así como la existencia de eventos de recombinación, mediante secuenciación de genomas completos. Los datos obtenidos no pudieron ser mas preocupantes, al encontrar unas tasas de coinfección no antes descritas entre genotipos invasivos y no invasivos y una tasas mas próximas a países en vías de desarrollo cuando estudiábamos la coinfección por >1 genotipo de variantes no invasivas. Este hallazgo podría ser un reflejo de la escasez de atención de los sistemas de Salud Pública que han llevado a España a ser uno de los pocos países europeos que no dispone de un sistema de notificación ni de genotipado ampliamente implementados. En el seno de este trabajo para cuantificar los porcentajes de coinfecciones, encontramos casi por casualidad una variante exitosa resultado de un proceso de recombinación en el gen *pmpH*. Se había comprobado la existencia de variantes recombinantes en muestras clínicas, como el caso de la cepa hipervirulenta del genotipo L2c; sin embargo, en nuestro conocimiento, no existe ninguna referencia en la literatura en cuanto al éxito adaptativo de una de estas variantes recombinantes en la población. La caracterización de varios clones clasificados inicialmente como *pmpH*-recombinantes nos llevó a nuevas y sorprendentes conclusiones sobre la dinámica de selección y dispersión de CT.

Si inicialmente la variante *pmpH*-recombinante resultó ser el resultado de un evento de recombinación entre un genotipo asociado a LGV y un genotipo G, con un patrón claro de individuo HSH y presentación rectal. La mayor variabilidad encontrada en los casos de 2014-2015 respecto a los de 2009-2010 indicaba una evolución continua de esta variante con múltiples eventos de transmisión (cuellos de botella). En el último periodo de estudio observamos como esta variante sufre un nuevo evento de recombinación, reemplazando el gen *ompA* del genotipo G por genotipo J. Esta observación fue coincidente la detección de individuos puente (bisexuales y prostitutas) infectados por esta variante, lo que permitía confirmar el papel de estos colectivos en la dispersión entre distintos grupos o redes sexuales, como reconoce la OMS. Este reemplazamiento es coincidente con una mayor dispersión de la variante al difuminarse más el patrón anteriormente descrito y empezar a describirse este variante en población heterosexual y en muestras no rectales. Este es un ejemplo de la rapidez con la que se producen, en tiempo real, modificaciones en la epidemiología molecular de esta bacteria, algo que antes de empezar esta Tesis nos parecía inimaginable. Para poder observar la dinámica de reemplazamiento es necesario implementar métodos de tipado universal para CT. Nosotros propusimos aunar los eventos de macro y microevolución como la mejor aproximación a este objetivo. En el proceso de elaboración de esta Tesis se ha publicado un esquema consenso de MLST (401). Cualquier iniciativa que permita obtener resultados

comparables y que permita responder a la pregunta cuya respuesta estemos buscando, será un gran avance.

Aunque finalmente no ha quedado reflejado en esta Tesis Doctoral un punto importante discutido en nuestro grupo ha sido la posible existencia de aislados de CT resistentes a los tratamientos antibióticos dada la persistencia de la infección tras el adecuado tratamiento. En los pocos casos que hemos podido analizar la reinfecciones eran producidas por genotipos diferentes al genotipo inicial (por amplificación y secuenciación de los genes *pmpH* y *ompA*). Sin embargo encontramos en la literatura descripción de bacterias de CT multirresistentes o *pan*-resistentes, cuando ningún mecanismo de resistencia ha podido ser demostrado en esta especie. Esta idea muy extendida de la resistencia antibiótica en CT esta generando un uso abusivo de otros antibióticos que podría ser evitado implementando el genotipado en muestras clínicas, tan cuestionado en el pasado “*porque no afectaría al tratamiento*”

En definitiva la infección por CT es una enfermedad silente que creíamos controlada, que mantenía una estructura poblacional estable y por tanto apenas requería atención. Si algo ha servido la realización de esta Tesis Doctoral es para revelar que esta especie bacteriana, al igual que cualquier otra, esta sometida a proceso de evolución continua, con rápidas dinámicas de transmisión y reemplazamiento de variantes en la población y nuevas entradas en nuestro entorno de nuevas variantes. Todas estas evidencias biológicas han servido también para constatar la mejoría necesaria que debe hacerse en el terreno del diagnóstico, genotipado, epidemiología molecular y sistemas de notificación que puedan dar respuesta a las necesidades de Salud Pública que esta Tesis ha planteado. Este sería el verdadero éxito de esta Tesis.



## **CONCLUSIONES**

- 1.** Se describe por primera vez la presencia de genotipos de *Chlamydia trachomatis* asociados a LGV en la Comunidad de Madrid. Al igual que en el resto de países europeos, en los que se han descrito casos, existe una fuerte asociación con infección por VIH en hombres que tienen sexo con hombres y frecuentemente la presencia concomitante de otras ITS.
- 2.** La caracterización molecular de los casos de LGV, revela la particularidad del brote de Madrid al demostrarse la circulación simultánea de dos variantes predominantes (L2b y L2/L2f). Este hallazgo difiere del resto de brotes descritos en otros países, en los que únicamente se describe la presencia mayoritaria de la variante L2b, habiéndose detectado la variante L2/L2f únicamente de forma ocasional.
- 3.** La detección de variantes minoritarias derivadas por mutaciones puntuales de L2 o L2b indica que existe transmisión activa de este genotipo en la población. Por otro lado, la presencia de mutaciones puntuales afectando a la misma posición en distintas variantes indica un posible fenómeno de selección positiva. Este fenómeno podría facilitar una adaptación específica de nicho. Esto explicaría porque durante el primer periodo (2009-2011) del estudio solo se detectan casos de localización rectal y en otras localizaciones sólo a partir de 2013.
- 4.** La naturaleza poco o nada sintomática de los casos asociados a la variante L2/L2f facilitaría por tanto su diseminación. Esto se confirma con los datos obtenidos en el año 2014, donde ya existe un predominio general de esta variante sobre L2b, especialmente en muestras rectales y afectando a todas las localizaciones, mientras que L2b no se detecta en muestras uretrales ni de cervix.
- 5.** Se detecta el mayor porcentaje de coinfecciones tanto entre genotipos invasivos y no invasivos (10,9 %) como entre genotipos no invasivos (14,6 %) descrito hasta la fecha. Esta situación epidemiológica constituye el escenario idóneo para la generación de nuevas variantes por procesos de intercambio genético.
- 6.** La distribución epidemiológica de genotipos en muestras con infección simple es similar a la descrita en otros países, con claro predominio de los genotipos E y D seguido de los genotipos F y G y siendo minoritario el grupo H-K. No se observa diferencias en esta distribución en los dos periodos de tiempo del estudio lo que demuestra que la introducción de genotipos asociados a LGV no ha alterado la epidemiología local de *Chlamydia trachomatis*.
- 7.** Se detecta la presencia de una variante recombinante en el gen *pmpH*, entre genotipos invasivos y no invasivos. El genotipado basado en *ompA* confirma que se trata de un genotipo G, previamente detectado en Seattle. El genotipo G es el minoritario en las muestras con coinfección con genotipos invasivos, lo que indicaría que esta variante recombinante no se ha seleccionado en nuestro entorno.

- 8.** Se detecta la acumulación de mutaciones puntuales en la variante encontrada en Madrid con respecto a la detectada en Seattle. Esto indicaría sucesivos eventos de transmisión (cuellos de botella), lo que estaría favorecido por la naturaleza asintomática, en localización rectal, de los casos en que se detectó esta variante.
- 9.** Los cambios acumulados en las cepas portando el gen *pmpH* recombinante detectadas en Madrid, permite identificar con soporte estadístico 2 clados de transmisión, revelando el posible éxito adaptativo de esta variante en nuestra población.
- 10.** El posterior estudio temporal confirma el éxito adaptativo de esta variante recombinante. La prevalencia en el periodo 2010-2013 fue 27,6% mientras que en el periodo 2014-2015 alcanzó el 39%.
- 11.** Paralelamente al aumento de prevalencia se detectan un cambio epidemiológico caracterizado por un salto poblacional a individuos heterosexuales y el hallazgo en de esta variante en otras localizaciones. Esta observación fue coincidente la detección de individuos puente (bisexuales y prostitutas) infectados por esta variante, lo que permitía confirmar el papel de estos colectivos en la dispersión entre distintos grupos o redes sexuales, como reconoce la OMS.
- 12.** La secuenciación del gen *ompA* de las nuevas cepas recombinantes, revela el reemplazamiento de gen *ompA* de genotipo G por *ompA* de genotipo J en cepas pertenecientes a las dos líneas evolutivas previamente descritas
- 13.** Se confirma por el análisis de genes conservados un origen ancestral común con los genotipos invasivos y relacionado con genotipos oculares. El análisis de genes conservados (*rs2* y *lysS*) demuestra que ambas cepas tienen un origen ancestral común, relacionado con genotipos oculares. El análisis de genes relacionados con la invasividad y la patogenicidad sitúa la variante recombinante junto con los genotipos urogenitales no invasivos.
- 14.** La elevada variabilidad del gen *ompA* como consecuencia de la presión selectiva a que está sujeto junto con la descripción de eventos de recombinación afectando a este gen, lo hace inadecuado para una caracterización de patotipos de *Chlamydia trachomatis*. Sin embargo, resulta de gran utilidad para definir eventos de microevolución.
- 15.** Se demuestra la utilidad de un método de caracterización genotípica de aislados de *Chlamydia trachomatis*, basado en el estudio de una combinación de genes conservados y genes relacionados con patogenicidad con capacidad para aunar fenómenos de macro y microevolución respectivamente. El análisis del concatenado de estos genes confirma la historia evolutiva de *Chlamydia trachomatis* obtenida previamente por análisis de genomas completos.



## **ANEXO-VI: PUBLICACIÓN**





# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

[www.elsevier.es/eimc](http://www.elsevier.es/eimc)



## Editorial

### Mejora del diagnóstico de las infecciones por *Chlamydia trachomatis* en la era molecular, una oportunidad para los sistemas de vigilancia

### Improving the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections in the molecular era, an opportunity for surveillance programs

Juan Carlos Galán\* y Mario Rodríguez-Domínguez

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, España

El *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) llevó a cabo una encuesta (SCREEn Project) en el año 2007 y nuevamente en 2012, entre 28 países europeos sobre los sistemas de detección y vigilancia de *Chlamydia trachomatis*. Este estudio confirmó el incremento imparable del uso de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN). En el año 2007 tan solo 9 países realizaban más del 90% del diagnóstico de las infecciones por *C. trachomatis* mediante TAAN, mientras que en el año 2012 17 países ya cumplían este criterio<sup>1</sup>. Aunque España participó en el proyecto SCREEn, no aportó información sobre el porcentaje de TAAN empleadas para el diagnóstico. Nuestra percepción es que en nuestro país se realiza la mayoría del diagnóstico de las infecciones por *C. trachomatis* por TAAN, pero no existe una red lo suficientemente amplia y robusta para saber el verdadero impacto de estas técnicas.

El primer ensayo basado en TAAN para la detección de *C. trachomatis* fue aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) en 1993<sup>2</sup>. Desde entonces 5 nuevos test diagnósticos han sido aprobados por FDA y un número mayor disponen únicamente del marcado CE. Existen muchos estudios comparativos entre las diferentes plataformas, con sensibilidad >90% y especificidad del 99%, desplazando de los laboratorios de diagnóstico al cultivo en línea celular, reconocido durante décadas como la técnica de referencia. En este número, Parra-Sánchez et al.<sup>3</sup> presentan los datos de un estudio comparativo entre 2 técnicas basadas en amplificación de ADN. Se detectaron tan solo 5/442 discrepancias (1,13%) entre ambas técnicas, sin embargo al no disponer de un estándar universal frente al que comparar los resultados para la validación de los métodos moleculares, estos estudios comparativos son difíciles de analizar. Los 2 sistemas comparados, CT OligoGen kit (Operon-Inmuno & Molecular Diagnostics, Zaragoza, España) y Cobas 4800 CT/NG Assay (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) utilizan 2 dianas (una en el plásmido críptico y otro en el gen *ompA*) para aumentar la sensibilidad diagnóstica, ya que después

de la experiencia de la variante de *C. trachomatis* identificada en Suecia en 2006, portadora de una delección de 377 bp en el plásmido críptico<sup>4</sup>, las técnicas, basadas en 2 dianas, deben llegar a ser el procedimiento diagnóstico de referencia dentro de las TAAN. Otra buena característica de las nuevas TAAN es que puedan detectar simultáneamente *C. trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, ya que las coinfecciones *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* son frecuentes (2,5% en el muestreo aleatorio de Parra-Sánchez o 15% en población de riesgo)<sup>3,5</sup>, por ejemplo >50% de los jóvenes con infección por *N. gonorrhoeae* tienen simultáneamente infección por *C. trachomatis*<sup>6</sup>. Aquellas plataformas que no puedan realizar esta doble detección (como ocurre con CT OligoGen kit) podrían tener un mercado más reducido, ya que clínicamente es difícil en muchos casos diferenciar una infección por uno u otro agente infeccioso.

Una interesante cuestión sobre el uso de las técnicas moleculares para el diagnóstico de las infecciones por *C. trachomatis* se refiere a cuál es el tipo de muestra adecuada. La FDA ha aprobado exclusivamente el uso de muestras genitourinarias para este diagnóstico (orina, exudado uretral y cervical). De hecho, parte del éxito en la implementación de TAAN en los programas de detección de *C. trachomatis* ha sido la posibilidad de utilizar muestras menos invasivas. Las últimas recomendaciones del CDC sugieren que la muestra óptima para mujeres es el exudado vaginal y la orina para los hombres<sup>7</sup>, ya que en mujeres se ha observado hasta un 10% menos de detecciones cuando la orina se comparó con exudado endocervical o vaginal<sup>8</sup>. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la carga bacteriana. Así, mientras que en hombres la mayor carga bacteriana se observa en la orina, en mujeres es en la orina donde se detecta la carga bacteriana más baja comparada con otros sitios anatómicos (4,8 veces mayor en el exudado vaginal)<sup>9</sup>. Referente al uso de muestras extragenitales (faringe, conjuntiva o recto) para el diagnóstico de *C. trachomatis*, las TAAN no han sido aprobadas por la FDA, si bien el CDC si las recomienda, basado en una mayor sensibilidad y un más fácil transporte y procesamiento de las muestras, pero limitado a poblaciones de riesgo como hombres que tienen sexo con hombres<sup>8</sup>, porque en este grupo más del 50% de las infecciones ocurrieron en sitios no uretrales<sup>10</sup>.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [juancarlos.galan@salud.madrid.org](mailto:juancarlos.galan@salud.madrid.org) (J.C. Galán).

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Fairchild AL, Colgrove J, Bayer R. The myth of exceptionalism: the history of venereal disease reporting in the twentieth century. *J Law Med Ethics*. 2003; 31:624-37
2. Talukdar, The History of Sexually Transmitted Diseases. *Int J Med Health Sci*. 2012; 1:83-88
3. R.S. Morton, Syphilis and its lookalikes', *Med.Historian*, 6(1993), 12-16; Cecil H. Clough, The discovery of America, the Italian wars, and the impact of syphilis on Western Christendom', *ibid*, 17-52
4. Plum B, Sexually transmitted diseases: An historical retrospect. Liverpool Medical History Society on 27 November 1997
5. Harkness AH. 1950. Non gonococcal urethritis. Ed Livingstone, Edimburg.
6. Piot. Response to the AIDS Pandemic -A Global Health Model. *N Engl J Med* 2013;368:2210-8
7. Rönn MM, Ward H. The association between lymphogranuloma venereum and HIV among men who have sex with men: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2011 Mar 18;11:70
8. Wald A, Link K. Risk of human immunodeficiency virus infection in herpes simplex virus type 2. Seropositive persons: a meta-analysis. *The Journal of Infectious Diseases*, 2002, 185:45-52.
9. Hayes RJ, Schulz KF, Plummer FA. The cofactor effect of genital ulcers in the per-exposure risk of HIV transmission in sub-Saharan Africa. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1995, 98:1-8.
10. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO) Working Group on HIV/AIDS and STI Surveillance. Strategies and laboratory methods for strengthening surveillance of sexually transmitted infections 2012. Geneva: WHO; 2012
11. Global strategy for the prevention and control of sexually transmitted infections: 2006-2015: breaking the chain of transmission. Geneva: World Health Organization; 2007
12. Mayaud P, Mabey D. Approaches to the control of sexually transmitted infections in developing countries: old problems and modern challenges. *Sex Transm Infect*. 2004 Jun;80(3):174-82
13. Owusu-Edusei K, et al. The estimated direct medical cost of selected sexually transmitted infections in the United States, 2008. *Sex Transm Dis* 2013; 40(3): pp. 197-201.
14. Tapsall JW, Ndowa F, Lewis DA, Unemo M. Meeting the public health challenge of multidrug- and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009; 7:821-834; Wright DJ *Lancet ID* 2013
15. Allen VG, Seah C, Martin I, Melano RG. Azithromycin resistance is coevolving with reduced susceptibility to cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae* in Ontario, Canada. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 May;58(5):2528-34
16. Cole MJ, Unemo M, Hoffmann S, Chisholm SA, Ison CA, van de Laar MJ. The European gonococcal antimicrobial surveillance programme, 2009. *Euro Surveill*. 2011 Oct 20;16(42))
17. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2013.)
18. Savage EJ, van de Laar MJ, Galloway A, van der Sande M, Hamouda O, Sasse A, Hoffmann S, Diez M, Borrego MJ, Lowndes CM, Ison C; European Surveillance of Sexually Transmitted Infections (ESSTI) network. Lymphogranuloma venereum in Europe, 2003-2008. *Euro Surveill*. 2009 Dec 3;14(48)
19. Mesher D, Soldan K, Howell-Jones R, Panwar K, Manyenga P, Jit M, Beddows S, Gill ON. Reduction in HPV 16/18 prevalence in sexually active young women following the introduction of HPV immunisation in England. *Vaccine*. 2013 Dec 17;32(1):26-32.
20. Subramanian T, Ramakrishnan L, Aridoss S, Goswami P, Kanguswami B, Shajan M, Adhikary R, Purushothaman GK, Ramamoorthy SK, Chinnaswamy E, Veeramani IB, Paranjape RS. Increasing condom use and declining STI prevalence in high-risk MSM and TGs: evaluation of a large-scale prevention program in Tamil Nadu, India. *BMC Public Health*. 2013 Sep 17;13:857
21. Chen XS, Peeling RW, Yin YP, Mabey DC. The epidemic of sexually transmitted infections in China: implications for control and future perspectives. *BMC Med*. 2011 Oct 6;9:111. doi: 10.1186/1741-7015-9-11
22. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2012. Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2013
23. Otero Guerra L, Lepe Jiménez JA, Blanco Galán MA, Aznar Martín J, Vázquez Valdés F. Utility of molecular biology techniques in the diagnosis of sexually transmitted diseases and genital infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008 Jul;26 Suppl 9:42-9
24. Guidelines for Second Generation HIV Surveillance: An Update: Know Your Epidemic. World Health Organization; 2013.
25. Huang ZJ, Wang W, Martin MC, Nehl EJ, Smith BD, Wong FY. Bridge population: sex workers or their clients? STI prevalence and risk behaviors of clients of female sex workers in China. *AIDS Care*. 2011 Jun;23 Suppl 1:45-53

26. Leigh Brown AJ, Lycett SJ, Weinert L, Hughes GJ, Fearnhill E, Dunn DT; UK HIV Drug Resistance Collaboration. Transmission network parameters estimated from HIV sequences for a nationwide epidemic. *J Infect Dis.* 2011 Nov;204(9):1463-9.
27. Diaz A, Garriga C, Varela JA, Fernández E, Sanz I, Boronat J, Gual F, Colomo C, López de Munain J, Esteban V, Junquera ML, Martínez B, Pueyo I, Suárez J, Barberá MJ, Arando M, Ureña JM, Diez M; STI Study Group. Gonorrhoea diagnoses in a network of STI clinics in Spain during the period 2006-2010: differences by sex and transmission route. *BMC Public Health.* 2013 Nov 25;13:1093.
28. Carvalho AM, Gonçalves S. Epidemics scenarios in the Romantic network. *PLoS One.* 2012;7(11):e49009.
29. Beymer MR, Weiss RE, Bolan RK, Rudy ET, Bourque LB, Rodriguez JP, Morisky DE. Sex on demand: geosocial networking phone apps and risk of sexually transmitted infections among a cross-sectional sample of men who have sex with men in Los Angeles county. *Sex Transm Infect.* 2014 Jun 12. pii: sextans-2013-051494. doi:10.1136/sextans-2013-051494.
30. Grosskopf NA, Levasseur MT, Glaser DB. Use of the Internet and Mobile-Based Apps for Sex-Seeking Among Men Who Have Sex With Men in New York City. *Am J Mens Health.* 2014 Mar 20.
31. Report on global sexually transmitted infection surveillance 2013. World Health Organization 2014
32. Liu XY, Hao C, Jiang H, Sun L, Zhou JB, Yin YP, Tang W, Jiang N, Mahapatra T, Mahapatra S, Chen XS, Yang HT, Fu GF, Huan XP. Syphilis and Its Correlates among Heterosexual Males Attending Sexually Transmitted Infection Clinics - Observation from a Multicity Cohort in Jiangsu Province, China. *PLoS One.* 2014;9(4):e95289
33. Rosenberg NE, Kamanga G, Pettifor AE, Bonongwe N, Mapanje C, Rutstein SE, Ward M, Hoffman IF, Martinson F, Miller WC. STI patients are effective recruiters of undiagnosed cases of HIV: results of a social contact recruitment study in Malawi. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2014 Apr 15;65(5):e162-9
34. Feng TJ (ed). *Epidemiology of sexually transmitted diseases and the factors related to the epidemic in Shenzhen.* Beijing: People's Health Publishing House; 2012
35. Urbanus AT, Van De Laar TJ, Giskus R, Vanhommerig JW, Van Rooijen MS, Schinkel J, Heijman T, Coutinho RA, Prins M. Trends in hepatitis C virus infections among MSM attending a sexually transmitted infection clinic; 1995-2010. *AIDS.* 2014 Mar 13;28(5):781-90.
36. Turovskiy Y, Sutyak Noll K, Chikindas ML. The aetiology of bacterial vaginosis. *J Appl Microbiol.* 2011 May;110(5):1105-28
37. Horner PJ, Gilroy CB, Thomas BJ, Naidoo RO, Taylor-Robinson D. Association of *Mycoplasma genitalium* with acute non-gonococcal urethritis. *Lancet.* 1993 Sep 4;342(8871):582-5.
38. Berntsson M, Löwhagen GB, Bergström T, Dubicanac L, Welinder-Olsson C, Alvengren G, Tunbäck P. Viral and bacterial aetiologies of male urethritis: findings of a high prevalence of Epstein-Barr virus. *Int J STD AIDS.* 2010 Mar;21(3):191-4
39. Payne BA, Medhi M, Ijaz S, Valappil M, Savage EJ, Gill ON, Tedder R, Schwab U. Hepatitis E virus seroprevalence among men who have sex with men, United Kingdom. *Emerg Infect Dis.* 2013 Feb;19(2):333-5.
40. Kostiala AA, Ranta T. Pelvic inflammatory disease caused by *Salmonella* panama and its treatment with ciprofloxacin. Case report. *Br J Obstet Gynaecol.* 1989 Jan;96(1):120-2
41. Amstey MS, Lewin E, Colaice J. Vaginal colonization with invasive *Escherichia coli* during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1980 Jul 1;137(5):534-5
42. Lichtenberger CJ, Perlino CA. *Campylobacter* and pelvic inflammatory disease. *Ann Intern Med.* 1982 Jul;97(1):147-8.
43. Burton MJ, Mabey DC. The global burden of trachoma: a review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009 Oct 27;3(10):e460.
44. Solomon AW, Peeling RW, Foster A, Mabey DC. Diagnosis and assessment of trachoma. *Clin Microbiol Rev.* 2004 Oct;17(4):982-1011
45. Heymann B, 1910. Über die Fundorte der Prowazek'schen Körperchen. *Berl Klin Wochenschr* 47:663-666
46. Lindner K. Gonoblenorrhoe, Einschlussblennorrhoe und Trachom. *Albrecht von Graefes Arch Klin Ophthalmol* 1911; 78:345-80.
47. Thygeson P. Ophthalmia Neonatorum: A Study of 261 Cases. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1936;34:340-71.
48. Schachter J, Meyer KF. Lymphogranuloma venereum. II. characterization of some recently isolated strains. *J Bacteriol.* 1969 Sep;99(3):636-8
49. Wang, S-P, Grayston, J. T.(1971). 'Trachoma and Related Disorders', ed. R. L. Nichols, p. 305. *Excerpta Medica.* Amsterdam and New York
50. Wang SP, Kuo CC, Barnes RC, Stephens RS, Grayston JT. Immunotyping of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal antibodies. *J Infect Dis.* 1985 Oct;152(4):791-800
51. Brunelle BW, Sensabaugh GF. The ompA gene in *Chlamydia trachomatis* differs in phylogeny and rate of evolution from other regions of the genome. *Infect Immun.* 2006 Jan;74(1):578-85
52. Engelman, D. M., T. A. Steitz, and A. Goldman. 1986. Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15:321-354

53. Nunes A, Borrego MJ, Nunes B, Florindo C, Gomes JP. Evolutionary dynamics of ompA, the gene encoding the Chlamydia trachomatis key antigen. *J Bacteriol.* 2009 Dec;191(23):7182-92
54. Harris SR, Clarke IN, Seth-Smith HM, Solomon AW, Cutcliffe LT, Marsh P, et al. Whole-genome analysis of diverse Chlamydia trachomatis strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing. *Nat Genet.* 2012 ;44:413-419
55. Gomes JP, Nunes A, Bruno WJ, Borrego MJ, Florindo C, Dean D. Polymorphisms in the nine polymorphic membrane proteins of Chlamydia trachomatis across all serovars: evidence for serovar Da recombination and correlation with tissue tropism. *J Bacteriol.* 2006 Jan;188(1):275-86
56. Collingro A, Tischler P, Weinmaier T, Penz T, Heinz E, Brunham RC, et al. Unity in variety--the pan-genome of the Chlamydiae. *Mol Biol Evol.* 2011;28:3253-70.
57. Ikryannikova LN, Shkarupeta MM, Shitikov EA, Ilina EN, Govorun VM. Comparative evaluation of new typing schemes for urogenital Chlamydia trachomatis isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010; 59:188-196
58. Joseph SJ, Didelot X, Gandhi K, Dean D, Read TD. Interplay of recombination and selection in the genomes of Chlamydia trachomatis. *Biol Direct.* 2011;6:28.
59. Mabey D, Peeling RW. Lymphogranuloma venereum. *Sex Transm Infect.* 2002 Apr;78(2):90-2
60. Group of the British Association for Sexual Health and HIV (CEG/BASHH). National Guideline for the Management of Lymphogranuloma Venereum (LGV) 2006 disponible en <http://www.bashh.org/documents/92/92.pdf>
61. Crohn Forrester B, Pawade J, Horner P. The potential role of serology in diagnosing chronic lymphogranuloma venereum (LGV): a case of LGV mimicking Crohn's disease. *Sex Transm Infect.* 2006 Apr;82(2):139-40
62. Singhrao T, Higham E, French P. Lymphogranuloma venereum presenting as perianal ulceration: an emerging clinical presentation? *Sex Transm Infect.* 2011 Mar;87(2):123-4
63. Hamill M, Benn P, Carder C, Copas A, Ward H, Ison C, French P. The clinical manifestations of anorectal infection with lymphogranuloma venereum (LGV) versus non-LGV strains of Chlamydia trachomatis: a case-control study in homosexual men. *Int J STD AIDS.* 2007 Jul;18(7):472-5
64. Sethi G, Allason-Jones E, Richens J, Annan NT, Hawkins D, Ekbote A, Alexander S, White J. Lymphogranuloma venereum presenting as genital ulceration and inguinal syndrome in men who have sex with men in London, UK. *Sex Transm Infect.* 2009 Jun;85(3):165-70.
65. Gupta S, Ajith C, Kanwar AJ, Sehgal VN, Kumar B, Mete U. Genital elephantiasis and sexually transmitted infections - revisited. *Int J STD AIDS.* 2006 Mar;17(3):157-65
66. Burstein GR, Zenilman JM. Nongonococcal urethritis--a new paradigm. *Clin Infect Dis.* 1999 Jan;28 Suppl 1:S66-73
67. Ito S, Tsuchiya T, Yasuda M, Yokoi S, Nakano M, Deguchi T. Prevalence of genital mycoplasmas and ureaplasmas in men younger than 40 years-of-age with acute epididymitis. *Int J Urol.* 2012 Mar;19(3):234-8
68. Mylonas I. Female genital Chlamydia trachomatis infection: where are we heading? *Arch Gynecol Obstet.* 2012 May;285(5):1271-85
69. Haggerty CL, Gottlieb SL, Taylor BD, Low N, Xu F, Ness RB. Risk of sequelae after Chlamydia trachomatis genital infection in women. *J Infect Dis.* 2010 Jun 15;201 Suppl 2:S134-55
70. Dean D, Suchland RJ, Stamm WE. Evidence for long-term cervical persistence of Chlamydia trachomatis by omp1 genotyping. *J Infect Dis.* 2000 Sep;182(3):909-16 Epub 2000 Aug 17. PubMed PMID: 10950788.
71. Alvarez-Navarro C, Cragolini JJ, Dos Santos HG, Barnea E, Admon A, Morreale A, López de Castro JA. Novel HLA-B27-restricted epitopes from Chlamydia trachomatis generated upon endogenous processing of bacterial proteins suggest a role of molecular mimicry in reactive arthritis. *J Biol Chem.* 2013 Sep 6;288(36):25810-25
72. Pendle S, Gowers A. Reactive arthritis associated with proctitis due to Chlamydia trachomatis serovar L2b. *Sex Transm Dis.* 2012 Jan;39(1):79-80
73. Eschenbach DA. Acute pelvic inflammatory disease. *Urol Clin North Am.* 1984 Feb;11(1):65-81.
74. Roden R, Wu TC. How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev Cancer.* 2006 Oct;6(10):753-63. Review
75. Vasilevsky S, Greub G, Nardelli-Haeffliger D, Baud D. Genital Chlamydia trachomatis: understanding the roles of innate and adaptive immunity in vaccine research. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Apr;27(2):346-70.
76. Mabey DC, Hu V, Bailey RL, Burton MJ, Holland MJ. Towards a safe and effective chlamydial vaccine: lessons from the eye. *Vaccine.* 2014 Mar 20;32(14):1572-8. Review.
77. Klausner RD, Fauci AS, Corey L, Nabel GJ, Gayle H, Berkley S, Haynes BF, Baltimore D, Collins C, Douglas RG, Esparza J, Francis DP, Ganguly NK, Gerberding JL, Johnston MI, Kazatchkine MD, McMichael AJ, Makgoba MW, Pantaleo G, Piot P, Shao Y, Tramont E, Varmus H, Wasserheit JN. Medicine. The need for a global HIV vaccine enterprise. *Science.* 2003 Jun 27;300(5628):2036-9.
78. Joesoef MR, Mosure DJ. Prevalence of Chlamydia in young men in the United States from newly implemented universal screening in a

national job training program. *Sex Transm Dis.* 2006 Oct;33(10):636-9

**79.** Yin YP, Wong SP, Liu MS, Wei WH, Yu YH, Gao X, Chen Q, Fu ZZ, Cheng F, Chen XS, Cohen MS. Improving strategies for syphilis control in China: selective testing of sexually transmitted disease patients--too little, too late? *Int J STD AIDS.* 2008 Dec;19(12):838-42.

**80.** Broad J, Cox T, Rodriguez S, Mansour M, Mennella C, Murphy-Swallow D, Raba JM, Wong W. The impact of discontinuation of male STD screening services at a large urban county jail: Chicago, 2002-2004. *Sex Transm Dis.* 2009 Feb;36(2 Suppl):S49-52.

**81.** Ezechi OC, Ostergren PO, Nwaokorie FO, Ujah IA, Odberg Pettersson K. The burden, distribution and risk factors for cervical oncogenic human papilloma virus infection in HIV positive Nigerian women. *Virol J.* 2014 Jan 15;11:5.

**82.** Novak D, Novak M. Use of the Internet for home testing for Chlamydia trachomatis in Sweden: who are the users? *Int J STD AIDS.* 2012 Feb;23(2):83-7.

**83.** Xu F, Stoner BP, Taylor SN, Mena L, Tian LH, Papp J, Hutchins K, Martin DH, Markowitz LE. Use of home-obtained vaginal swabs to facilitate rescreening for Chlamydia trachomatis infections: two randomized controlled trials. *Obstet Gynecol.* 2011 Aug;118(2 Pt 1):231-9.

**84.** Huppert JS, Taylor RG, St Cyr S, Hesse EA, Reed JL. Point-of-care testing improves accuracy of STI care in an emergency department. *Sex Transm Infect.* 2013;89:489-94.

**85.** Hui BB, Wilson DP, Ward JS, Guy RJ, Kaldor JM, Law MG, Hocking JS, Regan DG. The potential impact of new generation molecular point-of-care tests on gonorrhoea and chlamydia in a setting of high endemic prevalence. *Sex Health.* 2013;10:348-56.

**86.** Jaspard M, Le Moal G, Saberan-Roncato M, Plainchamp D, Langlois A, Camps P, Guigon A, Hocqueloux L, Prazuck T. Finger-Stick Whole Blood HIV-1/2 Home-Use Tests Are More Sensitive than Oral Fluid-Based In-Home HIV Tests. *PLoS One.* 2014 Jun 27;9(6):e101148

**87.** Guinard J, Prazuck T, Péré H, Poirier C, LeGoff J, Boedec E, Guigon A, Day N, Bélec L. Usefulness in clinical practice of a point-of-care rapid test for simultaneous detection of nontreponemal and *Treponema pallidum*-specific antibodies in patients suffering from documented syphilis. *Int J STD AIDS.* 2013 Dec;24(12):944-50

**88.** Natoli L, Maher L, Shephard M, Hengel B, Tangey A, Badman SG, Ward J, Guy RJ; TTANGO Investigators. Point-of-Care Testing for Chlamydia and Gonorrhoea: Implications for Clinical Practice. *PLoS One.* 2014 Jun 23;9(6):e100518.

**89.** Yang LG, Tucker JD, Liu FY, Ren XQ, Hong X, Wang C, McLaughlin MM, Bien CH, Chen XS, Yang B. Syphilis screening among

27,150 pregnant women in South Chinese rural areas using point-of-care tests. *PLoS One.* 2013 Aug 29;8(8):e72149.

**90.** van Dommelen L, van Tiel FH, Ouburg S, Brouwers EE, Terporten PH, Savelkoul PH, Morré SA, Bruggeman CA, Hoebe CJ. Alarming poor performance in Chlamydia trachomatis point-of-care testing. *Sex Transm Infect.* 2010 Oct;86(5):355-9.

**91.** Hsieh YH, Gaydos CA, Hogan MT, Uy OM, Jackman J, Jett-Goheen M, Albertie A, Dangerfield DT 2nd, Neustadt CR, Wiener ZS, Rompalo AM. What qualities are most important to making a point of care test desirable for clinicians and others offering sexually transmitted infection testing? *PLoS One.* 2011 Apr 29;6(4):e19263. doi: 10.1371/journal.pone.0019263.

**92.** Samarawickrama A, Cheserem E, Graver M, Wade J, Alexander S, Ison C. Pilot study of use of the BioStar® Optical ImmunoAssay (OIA) GC point-of-care test (POCT) for diagnosing gonorrhoea in men attending a GUM clinic. *J Med Microbiol.* 2014 Jun 6. pii: jmm.0.071852-0. doi: 10.1099/jmm.0.071852-0

**93.** Gaydos C, Hardick J. Point of care diagnostics for sexually transmitted infections: perspectives and advances. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014 Jun;12(6):657-72.

**94.** Gimenes F, Medina FS, Abreu AL, Irie MM, Esquicati IB, Malagutti N, Vasconcellos VR, Discacciati MG, Bonini MG, Maria-Engler SS, Consolaro ME. Sensitive Simultaneous Detection of Seven Sexually Transmitted Agents in Semen by Multiplex-PCR and of HPV by Single PCR. *PLoS One.* 2014 Jun 12;9(6):e98862

**95.** Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. *Clin Microbiol Rev.* 1997 Jan;10(1):160-84. Review

**96.** Warford, A., M. Chernesky and E.M. Peterson. 1999. Cumitech 19 A, Laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections. Coordinating ed., C.A. Gleaves. Amer. Soc. for Microbiology, Washington, D.C

**97.** An Q, Radcliffe G, Vassallo R, Buxton D, O'Brien WJ, Pelletier DA, Weisburg WG, Klinger JD, Olive DM. Infection with a plasmid-free variant Chlamydia related to Chlamydia trachomatis identified by using multiple assays for nucleic acid detection. *J Clin Microbiol.* 1992 Nov;30(11):2814-21

**98.** Magbanua JP, Goh BT, Michel CE, Aguirre-Andreasen A, Alexander S, Ushiro-Lumb I, Ison C, Lee H. Chlamydia trachomatis variant not detected by plasmid based nucleic acid amplification tests: molecular characterisation and failure of single dose azithromycin. *Sex Transm Infect.* 2007 Jul;83(4):339-43.

**99.** Chen CY, Chi KH, Alexander S, Martin IM, Liu H, Ison CA, Ballard RC. The molecular diagnosis of lymphogranuloma venereum: evaluation of a real-time multiplex polymerase



chain reaction test using rectal and urethral specimens. *Sex Transm Dis*. 2007 Jul;34(7):451-5.

**100.** Alexander S, Martin I, Ison C. Confirming the *Chlamydia trachomatis* status of referred rectal specimens. *Sex Transm Infect*. 2007 Jul;83(4):327-9.

**101.** Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*--2014. *MMWR Recomm Rep*. 2014 Mar 14;63(RR-02):1-19.

**102.** van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 2007 Oct;13 Suppl 3:1-46..

**103.** de Melo FL, de Mello JC, Fraga AM, Nunes K, Eggers S. Syphilis at the crossroad of phylogenetics and paleopathology. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 Jan 5;4(1):e575. doi: 10.1371/journal.pntd.0000575

**104.** Zehender G, Sorrentino C, Lai A, Ebranati E, Gabanelli E, Lo Presti A, Vujošević D, Laušević D, Terzi D, Shkjezi R, Bino S, Vratnica Z, Mugosa B, Galli M, Ciccozzi M. Reconstruction of the evolutionary dynamics of hepatitis C virus subtypes in Montenegro and the Balkan region. *Infect Genet Evol*. 2013 Jul;17:223-30.

**105.** Magiorkinis G, Sypsa V, Magiorkinis E, Paraskevis D, Katsoulidou A, Belshaw R, Fraser C, Pybus OG, Hatzakis A. Integrating phylodynamics and epidemiology to estimate transmission diversity in viral epidemics. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(1):e1002876

**106.** Ré VE, Culasso AC, Mengarelli S, Farías AA, Fay F, Pisano MB, Elbarcha O, Contigiani MS, Campos RH. Phylodynamics of hepatitis C virus subtype 2c in the province of Córdoba, Argentina. *PLoS One*. 2011;6(5):e19471.

**107.** González-Alba JM, Holguín A, García R, García-Bujalance S, Alonso R, Suárez A, Delgado R, Cardeñoso L, González R, García-Bermejo I, Portero F, de Mendoza C, González-Candelas F, Galán JC. Molecular surveillance of HIV-1 in Madrid, Spain: a phylogeographic analysis. *J Virol*. 2011 Oct;85(20):10755-63.

**108.** Katz KA, Pillay A, Ahrens K, Kohn RP, Hermansteyne K, Bernstein KT, Ballard RC, Klausner JD. Molecular epidemiology of syphilis--San Francisco, 2004-2007. *Sex Transm Dis*. 2010 Oct;37(10):660-3.

**109.** Aldous JL, Pond SK, Poon A, Jain S, Qin H, Kahn JS, Kitahata M, Rodriguez B, Dennis AM, Boswell SL, Haubrich R, Smith DM. Characterizing HIV transmission networks across the United States. *Clin Infect Dis*. 2012 Oct;55(8):1135-43

**110.** Lewis F, Hughes GJ, Rambaut A, Pozniak A, Leigh Brown AJ. Episodic sexual transmission of HIV revealed by molecular phylodynamics. *PLoS Med*. 2008;5:e50.

**111.** Volz EM, Ionides E, Romero-Severson EO, Brandt MG, Mokotoff E, Koopman JS. HIV-1 transmission during early infection in men who have sex with men: a phylodynamic analysis. *PLoS Med*. 2013 Dec;10(12):e1001568.

**112.** Wertheim JO, Leigh Brown AJ, Hepler NL, Mehta SR, Richman DD, Smith DM, Kosakovsky Pond SL. The global transmission network of HIV-1. *J Infect Dis*. 2014 Jan 15;209(2):304-13.

**113.** Myers J et al Ethics in Public Health Research. *Am J Public Health*. 2008 May; 98(5): 793-801.

**114.** Baseline report on global sexually transmitted infection surveillance 2012 WHO 2013.

**115.** Kramer MA, van Veen MG, de Coul EL, Geskus RB, Coutinho RA, van de Laar MJ, Prins M. Migrants travelling to their country of origin: a bridge population for HIV transmission? *Sex Transm Infect*. 2008 Dec;84(7):554-5.

**116.** Manieri M, Svensson H, Stafström M. Sex tourist risk behaviour--an on-site survey among Swedish men buying sex in Thailand. *Scand J Public Health*. 2013 Jun;41(4):392-7.

**117.** Crougns M, Remmen R, Van den Ende J. The effect of pre-travel advice on sexual risk behavior abroad: a systematic review. *J Travel Med*. 2014 Jan-Feb;21(1):45-51

**118.** Perrin L, Kaiser L, Yerly S. Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. *Lancet Infect Dis*. 2003 Jan;3(1):22-7.

**119.** Ward BJ, Plourde P. Travel and sexually transmitted infections. *J Travel Med*. 2006 Sep-Oct;13(5):300-17.

**120.** Yebra G, de Mulder M, Martín L, Rodríguez C, Labarga P, Viciano I, Berenguer J, Alemán MR, Pineda JA, García F, Holguín A; Cohort of the Spanish AIDS Research Network (CoRIS). Most HIV type 1 non-B infections in the Spanish cohort of antiretroviral treatment-naïve HIV-infected patients (CoRIS) are due to recombinant viruses. *J Clin Microbiol*. 2012 Feb;50(2):407-13.

**121.** von Wyl V, Kouyos RD, Yerly S, Böni J, Shah C, Bürgisser P, Klimkait T, Weber R, Hirschel B, Cavassini M, Staehelin C, Battegay M, Vernazza PL, Bernasconi E, Ledergerber B, Bonhoeffer S, Günthard HF; Swiss HIV Cohort Study. The role of migration and domestic transmission in the spread of HIV-1 non-B subtypes in Switzerland. *J Infect Dis*. 2011 Oct 1;204(7):1095-103

**122.** Miri L, Wakrim L, Kassar H, Hemminki K, Khyatti M. Impact of Immigration on HIV-1 Molecular Epidemiology in West Africa, Maghreb and Southern Europe. *AIDS Rev*. 2014 May 7;16(2).

123. European Centre for Disease Prevention and Control. Improving HIV data comparability in migrant populations and ethnic minorities in EU/EEA/EFTA countries: findings from a literature review and expert panel. Stockholm: ECDC; 2011.
124. Martin-Iguacel R, Llibre JM, Nielsen H, Heras E, Matas L, Lugo R, Clotet B, Sirera G. Lymphogranuloma venereum proctocolitis: a silent endemic disease in men who have sex with men in industrialised countries. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010 Aug;29(8):917-25.
125. Matteelli A, Schlagenhauf P, Carvalho AC, Weld L, Davis XM, Wilder-Smith A, Barnett ED, Parola P, Pandey P, Han P, Castelli F; GeoSentinel Surveillance Network. Travel-associated sexually transmitted infections: an observational cross-sectional study of the GeoSentinel surveillance database. *Lancet Infect Dis*. 2013 Mar;13(3):205-13.
126. Hook EW, Peeling J, Dolin R. Syphilis control—a continuing challenge. *N Engl J Med* 2004; 351: 122–24
127. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2010. Stockholm: ECDC; 2010
128. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance, 2008. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services; November 2009
129. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2012. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services; 2013.
130. Leigh Brown AJ, Lycett SJ, Weinert L, Hughes GJ, Fearnhill E, Dunn DT; UK HIV Drug Resistance Collaboration. (2011). Transmission network parameters estimated from HIV sequences for a nationwide epidemic. *J Infect Dis*; 204: 1463-1469
131. Thomas DR, Cann KF, Evans MR, Roderick J, Browning M, Birley HD, Curley W, Clark P, Northey G, Caple S, Lyons M. The public health response to the re-emergence of syphilis in Wales, UK. *Int J STD AIDS*. 2011 Sep;22(9):488-92
132. Muldoon E, Mulcahy F. Syphilis resurgence in Dublin, Ireland. *Int J STD AIDS*. 2011 Sep;22(9):493-7
133. Psutka R, Dickson N, Azariah S, Coughlan E, Kennedy J, Morgan J, Perkins N. Enhanced surveillance of infectious syphilis in New Zealand sexual health clinics. *Int J STD AIDS*. 2013 Oct;24(10):791-8
134. Kenyon et al Determinants of generalized herpes simplex virus-2 epidemics: the role of sexual partner concurrency *Int J STD AIDS*. 2013 May;24(5):375-82
135. De P, Singh AE, Wong T, Yacoub W. Outbreak of *Neisseria gonorrhoeae* in Northern Alberta, Canada. *Sex Transm Dis*. 2003 Jun;30(6):497-501
136. Tan NX, Tan GX, Yang LG, Yang B, Powers KA, Emch ME, Tucker JD. Temporal trends in syphilis and gonorrhoea incidences in Guangdong province, China. *J Inf Dis*. 2012, 1;209: 426-430
137. Doherty IA, Serre ML, Gesink D, Adimora AA, Muth SQ, Leone PA, Miller WC. Sexual networks, surveillance, and geographical space during syphilis outbreaks in rural North Carolina. *Epidemiology*. 2012 Nov;23(6):845-51
138. Rocha LEC, Liljeros F, Holme P (2011) Simulated Epidemics in an Empirical Spatiotemporal Network of 50,185 Sexual Contacts. *PLoS Comput Biol* 7(3): e1001109
139. Ward H. Prevention strategies for sexually transmitted infections: importance of sexual network structure and epidemic phase. *Sex Transm Infect*. 2007 Aug;83 Suppl 1:i43-49
140. Simms I, Bell G, Hughes G. Infectious syphilis in young heterosexuals: responding to an evolving epidemic. *Int. J STD and AIDS* 2011. 22: 481-482
141. Sutton MY, Liu H, Steiner B, Pillay A, Mickey T, Finelli L, Morse S, Markowitz LE, St Louis ME. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in an Arizona County with increasing syphilis morbidity: use of specimens from ulcers and blood. *J Infect Dis*. 2001 Jun 1;183(11):1601-6.
142. Thompson DK, Deal CD, Ison CA, Zenilman JM, Bash MC. A typing system for *neisseria gonorrhoeae* based on biotinylated oligonucleotide probes to *PIB* gene variable regions. *J Infect Dis*. 2000 May;181(5):1652-60.
143. Seth-Smith HM, Thomson NR. Whole-genome sequencing of bacterial sexually transmitted infections: implications for clinicians. *Curr Opin Infect Dis*. 2013;26(1):90-8
144. Ota KV et al. Identification of sexual networks through molecular typing of quinolone-resistance *Neisseria gonorrhoeae* in Ontario, Canada. *Sex transm Dis*. 2011. 38: 811-814
145. Grad YH. Et al. Genomic epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime in the USA: a retrospective observational study. *Lancet Inf Dis*. 2014 14:220-226
146. Chisholm SA, Unemo M, Quaye N, Johansson E, Cole MJ, Ison CA, Van de Laar MJ. Molecular epidemiological typing within the European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance Programme reveals predominance of a multidrug-resistant clone. *Euro Surveill*. 2013 Jan 17;18(3)
147. Walsh C. The silent epidemic of Chlamydia trachomatis: the urgent need for detection and treatment in women. *J. Womens health Gend Based Med*. 2000; 9: 339-343.

148. Beyrer C. Hidden epidemic of sexually transmitted diseases in China: crisis and opportunity. *JAMA*. 2003 Mar 12;289(10):1303-5.
149. Pedersen LN. Typing Chlamydia trachomatis: from egg yolk to nanotechnology. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2009; 55: 120-130
150. Medici A. Family outbreak of Chlamydia trachomatis. *Lancet* 1988 17; 2(8612):682
151. Unemo. The Swedish new variant of Chlamydia trachomatis. *Curr Opin Infect Dis.* 2011; 24: 62-69
152. Ripa T, Nilsson PA. A variant of Chlamydia trachomatis with deletion in cryptic plasmid: implication for use of PCR diagnostic test. *Euro Surveill* 2006. 11: E061109.1
153. Söderblom T et al. Impact of a genetic variant of Chlamydia trachomatis on national detection rates in Sweden. *Euro Surveill* 2006; 11:E061207.1
154. Hermann B. Emergence and spread of Chlamydia trachomatis variant, Sweden. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14: 1462-65
155. Seth-Smith HM, Harris SR, Persson K, Marsh P, Barron A, Bignell A, Bjartling C, Clark L, Cutcliffe LT, Lambden PR, Lennard N, Lockey SJ, Quail MA, Salim O, Skilton RJ, Wang Y, Holland MJ, Parkhill J, Thomson NR, Clarke IN. Co-evolution of genomes and plasmids within Chlamydia trachomatis and the emergence in Sweden of a new variant strain. *BMC Genomics.* 2009 May 21;10:239.
156. Steensels. Towards multitarget testing in molecular microbiology. *Int. J. Microbiol.* 2013
157. Persson et al. Decline of the new Swedish variant of Chlamydia trachomatis after introduction of appropriate testing. *Sex. Transm Infect* 2012; 88:451-5
158. Moghaddam A, Reinton N. Identification of the Swedish Chlamydia trachomatis variant among patients attending a STI clinic in Oslo, Norway. *Euro Surveill.* 2007 Mar 1;12(3):E070301.3.
159. Hoffmann S, Jensen JS. Mutant Chlamydia trachomatis in Denmark. *Euro Surveill.* 2007 Oct 1;12(10):E7-8. Erratum in: *Euro Surveill.* 2007 Nov;12(11):E071108.4.
160. Reischl U, Straube E, Unemo M. The Swedish new variant of Chlamydia trachomatis (nvCT) remains undetected by many European laboratories as revealed in the recent PCR/NAT ring trial organised by INSTAND e.V., Germany. *Euro Surveill.* 2009 Aug 13;14(32). pii: 19302
161. Shipitsyna E, Hadad R, Ryzhkova O, Savicheva A, Domeika M, Unemo M. First reported case of the Swedish new variant of Chlamydia trachomatis (nvCT) in Eastern Europe (Russia), and evaluation of Russian nucleic acid amplification tests regarding their ability to detect nvCT. *Acta Derm Venereol.* 2012 May;92(3):330-1.
162. Piñeiro L, Bernal S, Bordes A, Palomares JC, Gilarranz R, von Wichmann MA, Cilla G. Minimum spread of the new Swedish variant of Chlamydia trachomatis and distribution of C. trachomatis ompA genotypes in three geographically distant areas of Spain, 2011-2012. *Infection.* 2014 Oct;42(5):905-12.
163. Wallace W. A treatise on the venereal disease and its varieties. London 1933
164. Durand M, Nicolas J, Favre M. Lymphogranulomatose inguinale subaigue d'origine genitale probable, peutevre venerienne. *Bull Soc Med Hop Paris* 1913; 35:274-288.
165. Kampmeier RH. The Establishment of Lymphogranuloma Inguinale (Lymphopathia Venereum) as a Sexually Transmitted Disease. *Sexually Transmitted Diseases.* 1982. 9: 146-148
166. Coutts. Lymphogranuloma venereum: A general review. *Bull World Health Organ.* 1950; 2(4): 545-562
167. McLelland BA, Anderson PC. Lymphogranuloma venereum. Outbreak in a university community. *JAMA.* 1976 Jan 5;235(1):56-7;
168. Panizza E, Nigro M; Pascuale R et al. Epidemiologic consideration apropos of 6 cases of LGV recovered in Sicily in a 1-year period. *G. Ital Dermatol. Venereol* 1987; 122:11
169. Scieux C, Barnes R, Bianchi A, Casin I, Morel P, Perol Y. Lymphogranuloma venereum: 27 cases in Paris. *J Infect Dis.* 1989 Oct;160(4):662-8
170. Faro S. Lymphogranuloma venereum, chancroid, and granuloma inguinale. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 1989 Sep;16(3):517-30
171. Osoba AO. Sero-epidemiological study of Lymphogranuloma venereum in Western Nigeria. *Afr J Med Med Sci.* 1977 Sep;6(3):125-32.
172. Maurin M, Raoult D. Isolation in endothelial cell cultures of chlamydia trachomatis LGV (Seroovar L2) from a lymph node of a patient with suspected cat scratch disease. *J Clin Microbiol.* 2000 Jun;38(6):2062-4
173. Bauwens JE, Lampe MF, Suchland RJ, Wong K, Stamm WE. Infection with Chlamydia trachomatis lymphogranuloma venereum serovar L1 in homosexual men with proctitis: molecular analysis of an unusual case cluster. *Clin Infect Dis.* 1995 Mar;20(3):576-81
174. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Lymphogranuloma venereum among men who have sex with men--Netherlands, 2003-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2004 Oct 29;53(42):985-8
175. Nieuwenhuis RF, Ossewaarde JM, Götz HM, Dees J, Thio HB, Thomeer MG, den Hollander JC, Neumann MH, van der Meijden WI. Resurgence of lymphogranuloma venereum in Western Europe: an outbreak of Chlamydia trachomatis serovar l2 proctitis in The Netherlands among men who have sex with men. *Clin Infect Dis.* 2004 Oct 1;39(7):996-1003.

176. Vall-Mayans M, Caballero E, Sanz B. The emergence of lymphogranuloma venereum in Europe. *Lancet*. 2009 Jul 25;374(9686):356.
177. van de Laar MJ, Fenton KA, Ison C; ESSTI Network. Update on the European lymphogranuloma venereum epidemic among men who have sex with men. *Euro Surveill*. 2005 Jun 2;10(6):E050602.1.
178. Castro JG, Ponomareva O, Alcaide M, Rosa-Cunha I, Dilanchian P, Willis D. Increase in lymphogranuloma venereum cases in South Florida. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)*. 2012 Jul-Aug;11(4):220-2.
179. Stark D, van Hal S, Hillman R, Harkness J, Marriott D. Lymphogranuloma venereum in Australia: anorectal *Chlamydia trachomatis* serovar L2b in men who have sex with men. *J Clin Microbiol*. 2007 Mar;45(3):1029-31.
180. Vandenbruaene M, Ostyn B, Crucitti T, De Schrijver K, Sasse A, Sergeant M, Van Dyck E, Van Esbroeck M, Moerman F. Lymphogranuloma venereum outbreak in men who have sex with men (MSM) in Belgium, January 2004 to July 2005. *Euro Surveill*. 2005 Sep 29;10(9):E050929.3
181. Meyer T, Arndt R, von Krosigk A, Plettenberg A. Repeated detection of lymphogranuloma venereum caused by *Chlamydia trachomatis* L2 in homosexual men in Hamburg. *Sex Transm Infect*. 2005 Feb;81(1):91-2.
182. Macdonald N, Ison C, Martin I, Alexander S, Lowndes C, Simms I, Ward H. Initial results of enhanced surveillance for lymphogranuloma venereum (LGV) in England. *Euro Surveill*. 2005 Jan 27;10(1):E050127.5
183. Liassine N, Caulfield A, Ory G, Restellini A, de Barbeyrac B, Sitavanc R, Descombes MC, Luescher D. First confirmed case of lymphogranuloma venereum (LGV) in Switzerland. *Euro Surveill*. 2005 Jul 14;10(7):E050714.4
184. Herida M, Sednaoui P, Couturier E, Neau D, Clerc M, Scieux C, Kreplak G, Goulet V, Hamers FF, de Barbeyrac B. Rectal lymphogranuloma venereum, France. *Emerg Infect Dis*. 2005 Mar;11(3):505-6
185. Vall Mayans M, Sanz Colomo B, Ossewaarde JM. First case of LGV confirmed in Barcelona. *Euro Surveill*. 2005 Feb 3;10(2):E050203
186. Berglund T, Bratt G, Herrmann B, Karlsson A, Löfdahl M, Payne L. Two cases of lymphogranuloma venereum (LGV) in homosexual men in Stockholm. *Euro Surveill*. 2005 Mar 3;10(3):E050303.3
187. Kivi M, Koedijk FD, van der Sande M, van de Laar MJ. Evaluation prompting transition from enhanced to routine surveillance of lymphogranuloma venereum (LGV) in the Netherlands. *Euro Surveill*. 2008 Apr 3;13(14). pii: 8087.
188. Koedijk Eurosurv. 2007
189. Jebbari Sex Transm Infect 2007).
190. Timen A, Hulscher ME, Vos D, van de Laar MJ, Fenton KA, van Steenbergen JE, van der Meer JW, Grol RP. Control measures used during lymphogranuloma venereum outbreak, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2008 Apr;14(4):573-8
191. Dupin N. Sexually transmitted infections in France in 2009. *Rev Prat*. 2010 Apr 20;60(4):520-5.
192. Vanousova D, Zakoucka H, Jilich D, Rozsypal H, Stankova M, Zufanova S, Vojackova N, Hercogova J, Marvan J, Machala L. First detection of *Chlamydia trachomatis* LGV biovar in the Czech Republic, 2010-2011. *Euro Surveill*. 2012 Jan 12;17(2). pii: 20055.
193. Castro R, Baptista T, Vale A, Nunes H, Prieto E, Mansinho K, da Luz Martins Pereira F. Anorectal lymphogranuloma venereum: the first two confirmed cases in Portugal. *Euro Surveill*. 2008 Dec 11;13(50). pii: 19060
194. Cusini M, Boneschi V, Tanzi C, Girgenti V, De Vries H, Alessi E. Ano-rectal lymphogranuloma venereum: the first case in Italy. *G Ital Dermatol Venereol*. 2008 Feb;143(1):83-5
195. Sary G, Meyer T, Bangert C, Kohrgruber N, Gmeinhardt B, Kimbauer R, Jantschitsch C, Rieger A, Sary A, Geusau A. New *Chlamydia trachomatis* L2 strains identified in a recent outbreak of lymphogranuloma venereum in Vienna, Austria. *Sex Transm Dis*. 2008 Apr;35(4):377-82
196. Høie S, Knudsen LS, Gerstoft J. Lymphogranuloma venereum proctitis: a differential diagnose to inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2011 Apr;46(4):503-10
197. Korhonen S, Hiltunen-Back E, Puolakkainen M. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* in rectal and pharyngeal specimens: identification of LGV genotypes in Finland. *Sex Transm Infect*. 2012 Oct;88(6):465-9
198. Bošnjak Z, Džijan S, Pavlini? D, Peri? M, Ružman N, Križan IR, Lauc G, Antolovi?-Požgain A, Burazin J, Vukovi? D. Distribution of *Chlamydia trachomatis* serotypes in clinical urogenital samples from north-eastern Croatia. *Curr Microbiol*. 2012 Jun;64(6):552-60
199. Vargas-Legas H, Garcia de Olalla P, Arando M, Armengol P, Barbera M, Vall M, Vives A, Martin-Ezquerria G, Alsina M, Blanco J, Munoz C, Caballero E, Andreu A, Ros M, Gorrindo P, Dominguez A, Cayla J. Lymphogranuloma venereum: a hidden emerging problem, Barcelona, 2011. *Euro Surveill*. 2012 Jan 12;17(2). pii: 20057.
200. de Vrieze NH, van Rooijen M, Schim van der Loeff MF, de Vries HJ. Anorectal and inguinal lymphogranuloma venereum among men who have sex with men in Amsterdam, The Netherlands: trends over time, symptomatology and concurrent infections. *Sex Transm Infect*. 2013 Nov;89(7):548-52.

- 201.** Maatouk I, Moutran R. Lymphogranuloma venereum: the first case in Lebanon. *Int J STD AIDS*. 2014 May 29. pii: 0956462414538007
- 202.** Dosekun O, Edmonds S, Stockwell S, French P, White JA. Lymphogranuloma venereum detected from the pharynx in four London men who have sex with men. *Int J STD AIDS*. 2013 Jun;24(6):495-6.
- 203.** Peuchant O, Baldit C, Le Roy C, Trombert-Paolantoni S, Clerc M, Bébéar C, de Barbeyrac B. First case of Chlamydia trachomatis L2b proctitis in a woman. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Dec;17(12):E21-3.
- 204.** Lázaro MJ, López PM, Vall-Mayans M, Fernández BL, Rodríguez-Guardado A. A case of late-stage lymphogranuloma venereum in a woman in Europe. *Sex Transm Dis*. 2013 Oct;40(10):792-3.
- 205.** White JA. Manifestations and management of lymphogranuloma venereum. *Curr Opin Infect Dis*. 2009 Feb;22(1):57-66
- 206.** Høie S, Knudsen LS, Gerstoft J. Lymphogranuloma venereum proctitis: a differential diagnose to inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2011 Apr;46(4):503-10
- 207.** Gallegos M, Bradley D, Jakate S, Keshavarzian A. Lymphogranuloma venereum proctosigmoiditis is a mimicker of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2012 Jul 7;18(25):3317-21
- 208.** Bonn D. Lymphogranuloma venereum spread linked to reporting delay. *Lancet Infect Dis*. 2005 May;5(5):265
- 209.** Verweij SP, Ouburg S, de Vries H, Morré SA, van Ginkel CJ, Bos H, Sebens FW. The first case record of a female patient with bubonic lymphogranuloma venereum (LGV), serovariant L2b. *Sex Transm Infect*. 2012 Aug;88(5):346-7. doi:10.1136/sextrans-2011-050298. Epub 2012 Feb 22. PubMed PMID: 22363020.
- 210.** Koper NE, van der Sande MA, Gotz HM, Koedijk FD; Dutch STI Clinics. Lymphogranuloma venereum among men who have sex with men in the Netherlands: regional differences in testing rates lead to underestimation of the incidence, 2006-2012. *Euro Surveill*. 2013 Aug 22;18(34). pii: 20561
- 211.** de Vrieze NH, van Rooijen M, Speksnijder AG, de Vries HJ. Urethral lymphogranuloma venereum infections in men with anorectal lymphogranuloma venereum and their partners: the missing link in the current epidemic? *Sex Transm Dis*. 2013 Aug;40(8):607-8
- 212.** Ward H, Rönn M. Lymphogranuloma venereum in men who have sex in men: are we missing a reservoir of infection? *Sex Transm Dis*. 2013 Aug;40(8):609-10.
- 213.** Vall Mayans, Sanz B, Armengol P, Loureiro E. Outbreak of infectious syphilis and other STIs in men who have sex with men in Barcelona, 2002-3. *Eurosurveillance Weekly* 2004;8(44):28/10/2004
- 214.** Generalitat de Catalunya. Departament de Salut. Manual de Notificació de les Malalties de Declaració Obligatòria per a l'any 2007. Direcció General de Salut Pública: Barcelona, 2007
- 215.** Vall Mayans M, Caballero E, Garcia de Olalla P, Armengol P, Codina MG, Barberà MJ, Sanz B, Andreu A, Caylà JA. Outbreak of lymphogranuloma venereum among men who have sex with men in Barcelona 2007/08--an opportunity to debate sexual health at the EuroGames 2008. *Euro Surveill*. 2008 Jun 19;13(25). pii: 18908
- 216.** Vall-Mayans M, Isaksson J, Caballero E, Sallés B, Herrmann B. Bubonic lymphogranuloma venereum with multidrug treatment failure. *Int J STD AIDS*. 2014 Mar;25(4):306-8
- 217.** De Munain JL, Ezpeleta G, Imaz M, et al. Two lymphogranuloma venereum cases in a heterosexual couple in Bilbao (Spain). *Sex Transm Dis* 2008; 35: 918-919
- 218.** Piñeiro L, Montes M, Gil-Setas A, Camino X, Echeverría MJ, Cilla G. Genotyping of Chlamydia trachomatis in an area of northern Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009 Oct;27(8):462-4
- 219.** Adán Merino L, Gómez Senent S, Martín Alonso MA, Turrión JP, Martín Arranz E, Poza Cordón J, Escobedo Franco D, Segura Cabral JM. Lymphogranuloma venereum: an emergent disease. *Gastroenterol Hepatol*. 2010 May;33(5):416-7
- 220.** Mejuto P, Boga JA, Junquera M, Torreblanca A, Leiva PS. Genotyping Chlamydia trachomatis strains among men who have sex with men from a Northern Spain region: a cohort study. *BMJ Open*. 2013 Jun 20;3(6)
- 221.** Piñeiro L, Bernal S, Bordes A, Palomares JC, Gilarranz R, von Wichmann MA, Cilla G. Minimum spread of the new Swedish variant of Chlamydia trachomatis and distribution of C. trachomatis ompA genotypes in three geographically distant areas of Spain, 2011-2012. *Infection*. 2014 Oct;42(5):905-12. doi:10.1007/s15010-014-0665-6
- 222.** Wang SP, Grayston JT. Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test. *Am J Ophthalmol*. 1970 Sep;70(3):367-74
- 223.** Peterson EM, de la Maza LM. Restriction endonuclease analysis of DNA from Chlamydia trachomatis biovars. *J Clin Microbiol*. 1988 Apr;26(4):625-9.
- 224.** Stephens RS, Sanchez-Pescador R, Wagar EA, Inouye C, Urdea MS. Diversity of Chlamydia trachomatis major outer membrane protein genes. *J Bacteriol*. 1987 Sep;169(9):3879-85.
- 225.** Cai L, Kong F, Toi C, van Hal S, Gilbert GL. Differentiation of Chlamydia trachomatis lymphogranuloma venereum-related serovars from other serovars using multiplex allele-specific

polymerase chain reaction and high-resolution melting analysis. *Int J STD AIDS*. 2010 Feb;21(2):101-4.

**226.** Jalal H, Stephen H, Alexander S, Carne C, Sonnex C. Development of real-time PCR assays for genotyping of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol*. 2007 Aug;45(8):2649-53

**227.** Millman KL, Tavaré S, Dean D. Recombination in the *ompA* gene but not the *omcB* gene of *Chlamydia* contributes to serovar-specific differences in tissue tropism, immune surveillance, and persistence of the organism. *J Bacteriol*. 2001 Oct;183(20):5997-6008

**228.** Chen CY, Chi KH, Alexander S, Ison CA, Ballard RC. A real-time quadriplex PCR assay for the diagnosis of rectal lymphogranuloma venereum and non-lymphogranuloma venereum *Chlamydia trachomatis* infections. *Sex Transm Infect*. 2008 Aug;84(4):273-6.

**229.** Quint KD, Bom RJ, Bruisten SM, van Doorn LJ, Nassir Hajipour N, Melchers WJ, de Vries HJ, Morre SA, Quint WG. Comparison of three genotyping methods to identify *Chlamydia trachomatis* genotypes in positive men and women. *Mol Cell Probes*. 2010 Oct;24(5):266-70

**230.** Schaeffer A, Henrich B. Rapid detection of *Chlamydia trachomatis* and typing of the Lymphogranuloma venereum associated L-Serovars by TaqMan PCR. *BMC Infect Dis*. 2008 Apr ;8:56

**231.** Morré SA, Spaargaren J, Fennema JS, de Vries HJ, Coutinho RA, Peña AS. Real-time polymerase chain reaction to diagnose lymphogranuloma venereum. *Emerg Infect Dis*. 2005 Aug;11(8):1311-2

**232.** Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 1997 Dec 15;25(24):4876-82

**233.** Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*. 2008 Jul;25(7):1253-6

**234.** Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*. 2003 Oct;52(5):696-704

**235.** Anisimova M, Gascuel O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol*. 2006 Aug;55(4):539-52

**236.** Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009 Jun 1;25(11):1451-2

**237.** Méchali F, de Barbeyrac B, Aoun O, Mérens A, Imbert P, Rapp C. Doxycycline failure in lymphogranuloma venereum. *Sex Transm Infect*. 2010 Aug;86(4):278-9

**238.** Gomes JP, Nunes A, Florindo C, Ferreira MA, Santo I, Azevedo J, Borrego MJ. Lymphogranuloma venereum in Portugal: unusual

events and new variants during 2007. *Sex Transm Dis*. 2009 Feb;36(2):88-91

**239.** Nunes A, Nogueira PJ, Borrego MJ, Gomes JP. Adaptive evolution of the *Chlamydia trachomatis* dominant antigen reveals distinct evolutionary scenarios for B- and T-cell epitopes: worldwide survey. *PLoS One*. 2010 Oct 5;5(10). pii: e13171

**240.** [www.hpa.org.uk](http://www.hpa.org.uk)

**241.** Mohrmann G, Noah C, Sabranski M, Sahly H, Stellbrink H-J. Ongoing epidemic of lymphogranuloma venereum in HIV-positive men who have sex with men: how symptoms should guide treatment. *Journal of the International AIDS Society* 2014;17(4Suppl 3):19657. doi:10.7448/IAS.17.4.19657

**242.** Castro R, Baptista T, Vale A, Nunes H, Prieto E, Araújo C, Mansinho K, da Luz Martins Pereira F. Lymphogranuloma venereum serovar L2b in Portugal. *Int J STD AIDS*. 2010 Apr;21(4):265-6

**243.** Ward H, Martin I, Macdonald N, Alexander S, Simms I, Fenton K, French P, Dean G, Ison C. Lymphogranuloma venereum in the United kingdom. *Clin Infect Dis*. 2007 Jan 1;44(1):26-32

**244.** Kropp RY, Wong T; Canadian LGV Working Group. Emergence of lymphogranuloma venereum in Canada. *CMAJ*. 2005 Jun 21;172(13):1674-6

**245.** Richardson D, Goldmeier D. Lymphogranuloma venereum: an emerging cause of proctitis in men who have sex with men. *Int J STD AIDS*. 2007 Jan;18(1):11-4

**246.** Nieuwenhuis RF, Ossewaarde JM, van der Meijden WI, Neumann HA. Unusual presentation of early lymphogranuloma venereum in an HIV-1 infected patient: effective treatment with 1 g azithromycin. *Sex Transm Infect*. 2003 Dec;79(6):453-5

**247.** Kendall BA, Tardif KD, Schlager R. *Chlamydia trachomatis* L serovars and dominance of novel L2b *ompA* variants, U.S.A. *Sex Transm Infect*. 2014 Jun;90(4):336

**248.** Barrick JE and RE Lenski. *Nature Reviews Genetics* 2013. Genome dynamics during experimental evolution. 14; 827-839

**249.** Kuo CC, Wang SP, Holmes KK, Grayston JT. Immunotypes of *Chlamydia trachomatis* isolates in Seattle, Washington. *Infect Immun*. 1983 Aug;41(2):865-8

**250.** Somboonna N, Wan R, Ojcius DM, Pettengill MA, Joseph SJ, Chang A, Hsu R, Read TD, Dean D. Hypervirulent *Chlamydia trachomatis* clinical strain is a recombinant between lymphogranuloma venereum (L(2)) and D lineages. *MBio*. 2011 May 3;2(3):e00045-11

**251.** Oud EV, de Vrieze NH, de Meij A, de Vries HJ. Pitfalls in the diagnosis and management of inguinal lymphogranuloma venereum: important

lessons from a case series. *Sex Transm Infect.* 2014 Jun;90(4):279-82

**252.** van Rooijen MS, van der Loeff MF, Morré SA, van Dam AP, Speksnijder AG, de Vries HJ. Spontaneous pharyngeal Chlamydia trachomatis RNA clearance. A cross-sectional study followed by a cohort study of untreated STI clinic patients in Amsterdam, The Netherlands. *Sex Transm Infect.* 2015 May;91(3):157-64

**253.** Reyes-Urueña JM, Garcia De Olalla P, Vall-Mayans M, Arando M, Caballero E, Cayla JA; Barcelona STI Group. Lymphogranuloma venereum in Barcelona, 2007-2012: the role of seroadaptation in men who have sex with men. *Epidemiol Infect.* 2015 Jan;143(1):184-8

**254.** Schmutz C, Burki D, Frei R, Mäusezahl-Feuz M, Mäusezahl D. Testing for Chlamydia trachomatis: time trends in positivity rates in the canton of Basel-Stadt, Switzerland. *Epidemiol Infect.* 2013 Sep;141(9):1953-64.

**255.** Corbeto EL, Lugo R, Martró E, Falguera G, Ros R, AVECILLA A, Coll C, Saludes V, Casabona J. [Prevalence and determining factors of acquiring C. trachomatis infection among adolescents and young adults in Catalonia]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011 Feb;29(2):96-101.

**256.** Fernández-Benítez C, Mejuto-López P, Otero-Guerra L, Margolles-Martins MJ, Suárez-Leiva P, Vazquez F; Chlamydial Primary Care Group. Prevalence of genital Chlamydia trachomatis infection among young men and women in Spain. *BMC Infect Dis.* 2013 Aug 22;13:388

**257.** Luis Piñeiro, Magnus Unemo and Gustavo Cilla. Absence of Swedish New Variant Chlamydia trachomatis (nvCT) and C. trachomatis Genotype Distribution in Gipuzkoa, Spain, 2009–2010 *Acta Dermato-Venereologica* 2012; 92: 185-186.

**258.** [www.gov.uk/government/publications/health-protection-report-volume-8-2014](http://www.gov.uk/government/publications/health-protection-report-volume-8-2014)

**259.** Bevan CD, Johal BJ, Mumtaz G, Ridgway GL, Siddle NC. Clinical, laparoscopic and microbiological findings in acute salpingitis: report on a United Kingdom cohort. *Br J Obstet Gynaecol.* 1995 May;102(5):407-14

**260.** Schachter J, Hook EW 3rd, McCormack WM, Quinn TC, Chernesky M, Chong S, Girdner JI, Dixon PB, DeMeo L, Williams E, Cullen A, Lorincz A. Ability of the digene hybrid capture II test to identify Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in cervical specimens. *J Clin Microbiol.* 1999 Nov;37(11):3668-71

**261.** Osler S, Persson K. Epidemiologic and serodiagnostic aspects of chlamydial salpingitis. *Obstet Gynecol.* 1982 Feb;59(2):206-9

**262.** Jolly AM, Muth SQ, Wylie JL, Potterat JJ. Sexual networks and sexually transmitted infections: a tale of two cities. *J Urban Health.* 2001 Sep;78(3):433-45

**263.** Torrone E, Papp J, Weinstock H; Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

Prevalence of Chlamydia trachomatis genital infection among persons aged 14-39 years--United States, 2007-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2014 Sep 26;63(38):834-8

**264.** Latino MA, Caneparo A, Rosso C, De Maria D, De Intinis G, Intorcia P, Petrinco M. Prevalence and risk factors for Chlamydia trachomatis infection in young women in north-west of Italy. *Minerva Ginecol.* 2008 Feb;60(1):29-37

**265.** Bom RJ, van der Helm JJ, Bruisten SM, Grünberg AW, Sabajo LO, Schim van der Loeff MF, de Vries HJ. The role of Surinamese migrants in the transmission of Chlamydia trachomatis between Paramaribo, Suriname and Amsterdam, The Netherlands. *PLoS One.* 2013 Nov 13;8(11):e77977

**266.** Foschi C, Marangoni A, D'Antuono A, Nardini P, Compri M, Bellavista S, Filippini A, Bacchi Reggiani ML, Cevenini R. Prevalence and predictors of Lymphogranuloma venereum in a high risk population attending a STD outpatients clinic in Italy. *BMC Res Notes.* 2014 Apr 9;7:225

**267.** European Centre for Disease Control and Prevention. (2011). Sexually transmitted infections in Europe, 1990–2009. Stockholm: ECDC. doi 10.2900/52553.

**268.** Health Protection Agency. National Chlamydia screening programme. Core requirements 6th ed. Update 2HPA 2013

**269.** Gaydos C.A. Chlamydia trachomatis: Molecular testing methods. Chapter 4 in Chlamydial infection: A clinical and public health perspective. Black CM (Ed) *Issues Infect Dis.* Basel. 2013

**270.** Weill FX et al. Serological reactivity and bacterial genotype in Chlamydia trachomatis urogenital infections in Guadalupe, French West Indies. *Sex Transm Dis.* 2010; 86: 101-105

**271.** Lyytikäinen BMC Inf Dis. 2008. A discrepancy of chlamydia trachomatis incidence and prevalence trends in Finland 1983-2003

**272.** Health Protection Agency. Health Protection Report. Weekly report. 2014; 8. UK

**273.** European Centre for Disease Prevention and Control. Sexually transmitted infections in Europe 2012. Stockholm ECDC 2014

**274.** Fenton KA, Lowndes CM. Recent trends in the epidemiology of sexually transmitted infections in the European Union. *Sex Transm Infect.* 2004. Aug;80(4):255-63

**275.** Bush RM, Everett KD. Molecular evolution of the Chlamydiaceae. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001

**276.** Jeffrey BM, Suchland RJ, Eriksen SG, Sandoz KM, Rockey DD. Genomic and phenotypic characterization of in vitro-generated Chlamydia trachomatis recombinants. *BMC Microbiol.* 2013 Jun 20;13:142

**277.** Gratrix J, Singh AE, Bergman J, Egan C, Plitt SS, McGinnis J, Bell CA, Drews SJ, Read R.

Evidence for Increased Chlamydia Case Finding After the Introduction of Rectal Screening Among Females Attending Two Canadian STI Clinics. *Clin Infect Dis*. 2014 Oct 21. pii: ciu831

**278.** de Vries HJ, Zingoni A, White JA, Ross JD, Kreuter A. 2013 European Guideline on the management of proctitis, proctocolitis and enteritis caused by sexually transmissible pathogens. *Int J STD AIDS*. 2013 Dec 18;25(7):465-474

**279.** Weiss E. 1955. The nature of the psittacosis-lymphogranuloma group of microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 9:227-252.

**280.** Wenner H. A. 1958. Psittacosis-lymphogranuloma venereum group of viruses. *Advan. Virus Res.* 5:39-93

**281.** Jenkin H. M. 1960. Preparation and properties of cell walls of the agent of meningopneumonitis. *J. Bacteriol.* 80:639-647.

**282.** Caldwell H. D., and J. Schachter. 1982. Antigenic analysis of the major outer membrane protein of *Chlamydia* spp. *Infect. Immun.* 35:1024-1031;

**283.** Newhall W. J. t., P. Terho, C. E. Wilde, 3rd, B. E. Batteiger, and R. B. Jones. 1986. Serovar determination of *Chlamydia trachomatis* isolates by using type-specific monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 23:333-338

**284.** Baehr, W, Zhang YX, Joseph, T, et al. Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* outer membrane protein genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:4000-4004

**285.** Caldwell HD, Kromhout J, Schachter J. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 1981 Mar;31(3):1161-76

**286.** Wylie JL, Iliffe ER, Wang LL, McClarty G. Identification, characterization, and developmental regulation of *Chlamydia trachomatis* 3-deoxy-D-manno-octulosonate (KDO)-8-phosphate synthetase and CMP-KDO synthetase. *Infect Immun.* 1997 Apr;65(4):1527-30

**287.** Jones HM, Kubo A, Stephens RS. Design, expression and functional characterization of a synthetic gene encoding the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein. *Gene*. 2000 Nov 27;258(1-2):173-81

**288.** Su H, Watkins NG, Zhang YX, Caldwell HD. *Chlamydia trachomatis*-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin. *Infect Immun.* 1990 pr;58(4):1017-25

**289.** Swanson AF, Kuo CC. Binding of the glycan of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* to HeLa cells. *Infect Immun.* 1994 Jan;62(1):24-8

**290.** Confer AW, Ayalew S. The *OmpA* family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Vet Microbiol.* 2013 May 3;163(3-4):207-22

**291.** Nunes A, Nogueira PJ, Borrego MJ, Gomes JP. *Chlamydia trachomatis* diversity viewed as a tissue-specific coevolutionary arms race. *Genome Biol.* 2008 Oct 23;9(10):R153

**292.** Brunelle BW, Sensabaugh GF. Nucleotide and phylogenetic analyses of the *Chlamydia trachomatis* *ompA* gene indicates it is a hotspot for mutation. *BMC Res Notes*. 2012 Jan 20;5:53

**293.** Hayes LJ, Yearsley P, Treharne JD, Ballard RA, Fehler GH, Ward ME. Evidence for naturally occurring recombination in the gene encoding the major outer membrane protein of lymphogranuloma venereum isolates of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 1994 Dec;62(12):5659-63

**294.** Lan J, Walboomers JM, Roosendaal R, van Doornum GJ, MacLaren DM, Meijer CJ, van den Brule AJ. Direct detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in cervical scrapes by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 1993 May;31(5):1060-5

**295.** Li JH, Yin YP, Zheng HP, Zhong MY, Peng RR, Wang B, Chen XS. A high-resolution melting analysis for genotyping urogenital *Chlamydia trachomatis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010 Dec;68(4):366-74

**296.** Gharsallah H, Frikha-Gargouri O, Besbes F, Sellami H, Znazen A, Hammami A. Development and application of an in-house reverse hybridization method for *Chlamydia trachomatis* genotyping. *J Appl Microbiol.* 2012 Oct;113(4):846-55

**297.** Huang CT, Li SY. Protocol for the use of a bead array for the multiple detection of genotype of *Chlamydia trachomatis*. *Methods Mol Biol.* 2012;903:195-204

**298.** Nunes A, Gomes JP. Evolution, phylogeny, and molecular epidemiology of *Chlamydia*. *Infect Genet Evol.* 2014 Apr;23:49-64.

**299.** Clarke IN. Evolution of *Chlamydia trachomatis*. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Aug;1230:E11-8.

**300.** Borges V, Nunes A, Ferreira R, Borrego MJ, Gomes JP. Directional evolution of *Chlamydia trachomatis* towards niche-specific adaptation. *J Bacteriol.* 2012 Nov;194(22):6143-53.

**301.** Jeffrey BM, Suchland RJ, Quinn KL, Davidson JR, Stamm WE, Rockey DD. Genome sequencing of recent clinical *Chlamydia trachomatis* strains identifies loci associated with tissue tropism and regions of apparent recombination. *Infect Immun.* 2010 Jun;78(6):2544-53

**302.** Lutter EI, Bonner C, Holland MJ, Suchland RJ, Stamm WE, Jewett TJ, McClarty G, Hackstadt T. Phylogenetic analysis of *Chlamydia trachomatis* Tarp and correlation with clinical phenotype. *Infect Immun.* 2010 Sep;78(9):3678-88

**303.** Clifton DR, Dooley CA, Grieshaber SS, Carabeo RA, Fields KA, Hackstadt T. Tyrosine



phosphorylation of the chlamydial effector protein Tarp is species specific and not required for recruitment of actin. *Infect Immun.* 2005 Jul;73(7):3860-8.

**304.** Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, Mitchell W, Olinger L, Tatusov RL, Zhao Q, Koonin EV, Davis RW. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science.* 1998 Oct 23;282(5389):754-9

**305.** Stothard DR, Toth GA, Batteiger BE. Polymorphic membrane protein H has evolved in parallel with the three disease-causing groups of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 2003 Mar;71(3):1200-8

**306.** Grimwood J, Stephens RS. Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. *Microb Comp Genomics.* 1999;4(3):187-201

**307.** Rockey DD, Lenart J, Stephens RS. Genome sequencing and our understanding of chlamydiae. *Infect Immun.* 2000 Oct;68(10):5473-9

**308.** Henderson IR, Lam AC. Polymorphic proteins of *Chlamydia* spp.--autotransporters beyond the Proteobacteria. *Trends Microbiol.* 2001 Dec;9(12):573-8

**309.** Gomes JP, Hsia RC, Mead S, Borrego MJ, Dean D. Immunoreactivity and differential developmental expression of known and putative *Chlamydia trachomatis* membrane proteins for biologically variant serovars representing distinct disease groups. *Microbes Infect.* 2005 Mar;7(3):410-20

**310.** Gomes JP, Bruno WJ, Borrego MJ, Dean D. Recombination in the genome of *Chlamydia trachomatis* involving the polymorphic membrane protein C gene relative to ompA and evidence for horizontal gene transfer. *J Bacteriol.* 2004 Jul;186(13):4295-306

**311.** Stevens MP, Twin J, Fairley CK, Donovan B, Tan SE, Yu J, Garland SM, Tabrizi SN. Development and evaluation of an ompA quantitative real-time PCR assay for *Chlamydia trachomatis* serovar determination. *J Clin Microbiol.* 2010 Jun;48(6):2060-5

**312.** Kaltenboeck B, Kousoulas KG, Storz J. Two-step polymerase chain reactions and restriction endonuclease analyses detect and differentiate ompA DNA of *Chlamydia* spp. *J Clin Microbiol.* 1992 May;30(5):1098-104.

**313.** Van Duynhoven YT, Ossewaarde JM, Derksen-Nawrocki RP, van der Meijden WI, van de Laar MJ. (1998) *Chlamydia trachomatis* genotypes: correlation with clinical manifestations of infection and patients characteristics. *Clin Infect Dis.* 26:314-322.

**314.** Jurstrand M, Falk L, Fredlund H, Lindberg M, Olcén P, et al. (2001) Characterization of *Chlamydia trachomatis* omp1 genotypes among

sexually transmitted disease patients in Sweden. *J Clin Microbiol;* 39: 3915-3919.

**315.** Klint M, Löfdahl M, Ek C, Airell A, Berglund T, et al. (2006) Lymphogranuloma venereum prevalence in Sweden among men who have sex with men and characterization of *Chlamydia trachomatis* ompA genotypes. *J Clin Microbiol;* 44: 4066-4071.

**316.** Bandea CI; Kubota K, Brown TM, Kilmarx PH, Bhullar V, et al. (2001) Typing of *Chlamydia trachomatis* strains from urine samples by amplification and sequencing the major outer membrane protein gen (omp1) Sex. Transm. Infect. 77; 419-422.

**317.** Twin J, Moore EE, Garland SM, Stevens MP, Fairley CK, et al. (2011) *Chlamydia trachomatis* genotypes among men who have sex with men in Australia, Sex Transm Dis 38; 279-285.

**318.** Lee G, Park J, Kim B, Kim SA, Yoo CK, et al. (2006) ompA genotyping of *Chlamydia trachomatis* from Korean female sex workers. *J Infect;* 52: 451-454

**319.** Molano M, Meijer CJ, Weiderpass E, Arslan A, Posso H, et al. (2005) The natural course of *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic Colombian women: a 5-year follow-up study. *J Infect Dis;* 191: 907-916.

**320.** Gharsallah H, Frikha-Gargouri O, Sellami H, Besbes F, Znazen A, et al. (2012) *Chlamydia trachomatis* genovar distribution in clinical urogenital specimens from Tunisian patients: high prevalence of C. trachomatis genovar E and mixed infections. *BMC Infect Dis;* 12:333. doi: 10.1186/1471-2334-12-333.

**321.** Zhang JJ, Zhao GL, Wang F, Hong FC, Luo ZZ, et al. (2012) Molecular epidemiology of genital *Chlamydia trachomatis* infection in Shenzhen, China. *Sex Transm Infect;* 88: 272-277

**322.** Suchland RJ, Sandoz KM, Jeffrey BM, Stamm WE, Rockey DD. 2009 Horizontal transfer of tetracycline resistance among *Chlamydia* spp. in vitro. *Antimicrob Agents Chemother;* 53:4604-4611

**323.** van de Laar MJ, Morré SA. *Chlamydia*: a major challenge for public health. *Euro Surveill.* 2007 Oct 1;12(10):E1-2

**324.** Cecilia Cuffini, Marina Bottiglieri, Ximena Kiguen, Carlos E. Alonso, Romina Valdes Deimundo, María Beatriz Isa, Roxana Cannistraci, Silvia Gonzalez, Alicia Farinati. Molecular Epidemiology of Genital *Chlamydia Trachomatis* Infection in Asymptomatic Adolescent-Young People *Journal of Microbiology Research* 2012, 2(4): 114-117

**325.** Lan J, Melgers I, Meijer CJ, Walboomers JM, Roosendaal R, Burger C, Bleker OP, van den Brule AJ. Prevalence and serovar distribution of asymptomatic cervical *Chlamydia trachomatis* infections as determined by highly sensitive PCR. *J Clin Microbiol.* 1995 Dec;33(12):3194-7.

326. Haar K, Dudareva-Vizule S, Wisplinghoff H, Wisplinghoff F, Sailer A, Jansen K, Henrich B, Marcus U. Lymphogranuloma venereum in men screened for pharyngeal and rectal infection, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2013 Mar;19(3):488-92
327. Batteiger BE, Tu W, Ofner S, Van Der Pol B, Stothard DR, Orr DP, Katz BP, Fortenberry JD. Repeated Chlamydia trachomatis genital infections in adolescent women. *J Infect Dis.* 2010 Jan 1;201(1):42-51
328. Nordvik MK, Liljeros F, Osterlund A, Herrmann B. Spatial bridges and the spread of Chlamydia: the case of a county in Sweden. *Sex Transm Dis.* 2007 Jan;34(1):47-53
329. Dean D, Rothschild J, Ruettinger A, Kandel RP, Sachse K. Zoonotic Chlamydiaceae species associated with trachoma, Nepal. *Emerg Infect Dis.* 2013 Dec;19(12):1948-55
330. Kесе D, Potocnik M, Maticic M, Kogoj R. Genotyping of Chlamydia trachomatis directly from urogenital and conjunctiva samples using an ompA gene pyrosequencing-based assay. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011 Nov;63(2):210-6
331. Ikehata M, Numazaki K, Chiba S. Analysis of Chlamydia trachomatis serovars in endocervical specimens derived from pregnant Japanese women. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000 Jan;27(1):35-41
332. Joseph SJ, Didelot X, Rothschild J, de Vries HJ, Morré SA, Read TD, Dean D. Population genomics of Chlamydia trachomatis: insights on drift, selection, recombination, and population structure. *Mol Biol Evol.* 2012 Dec;29(12):3933-46
333. Andreasen AA, Burton MJ, Holland MJ, Polley S, Faal N, Mabey DC, Bailey RL. Chlamydia trachomatis ompA variants in trachoma: what do they tell us? *PLoS Negl Trop Dis.* 2008 Sep 24;2(9):e306
334. Zhang J, Lietman T, Olinger L, Miao Y, Stephens RS. Genetic diversity of Chlamydia trachomatis and the prevalence of trachoma. *Pediatr Infect Dis J.* 2004 Mar;23(3):217-20
335. Takourt B, de Barbeyrac B, Khyatti M, Radouani F, Bebear C, Dessus-Babus S, Bebear C, Benslimane A. Direct genotyping and nucleotide sequence analysis of VS1 and VS2 of the Omp1 gene of Chlamydia trachomatis from Moroccan trachomatous specimens. *Microbes Infect.* 2001 May;3(6):459-66
336. Geisler WM, Black CM, Bandea CI, Morrison SG. Chlamydia trachomatis OmpA genotyping as a tool for studying the natural history of genital chlamydial infection. *Sex Transm Infect.* 2008 Dec;84(7):541-4
337. Christerson L, Bom RJ, Bruisten SM, Yass R, Hardick J, Bratt G, Gaydos CA, Morré SA, Herrmann B. Chlamydia trachomatis strains show specific clustering for men who have sex with men compared to heterosexual populations in Sweden, the Netherlands, and the United States. *J Clin Microbiol.* 2012 Nov;50(11):3548-55
338. Yang CJ, Li SY, Chang SY, Wu PY, Liao MH, Liu WC, Wu H, Wu CH, Sun HY, Hung CC. Associated factors with and genotypes of Chlamydia trachomatis infection among clients seeking voluntary counseling and testing for HIV infection in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2014 Dec;47(6):526-32
339. de Jesús De Haro-Cruz M, Deleón-Rodríguez I, Escobedo-Guerra MR, López-Hurtado M, Arteaga-Troncoso G, Ortiz-Ibarra FJ, Guerra-Infante FM. Genotyping of Chlamydia trachomatis from endocervical specimens of infertile Mexican women. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011 Feb;29(2):102-8
340. Taheri Beni B, Motamedi H, Ardakani MR. Genotyping of the prevalent Chlamydia trachomatis strains involved in cervical infections in women in Ahvaz, Iran. *J Med Microbiol.* 2010 Sep;59(Pt 9):1023-8
341. Sambrook J, Fritschi EF and Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
342. Lan J, Ossewaarde JM, Walboomers JM, Meijer CJ, van den Brule AJ. Improved PCR sensitivity for direct genotyping of Chlamydia trachomatis serovars by using a nested PCR. *J Clin Microbiol.* 1994 Feb;32(2):528-30
343. Gomes JP, Bruno WJ, Nunes A, Santos N, Florindo C, Borrego MJ, Dean D. Evolution of Chlamydia trachomatis diversity occurs by widespread interstrain recombination involving hotspots. *Genome Res.* 2007 Jan;17(1):50-60
344. Heath, L., van der Walt, E., Varsani, A. & Martin D.P. Recombination patterns in aphthoviruses mirror those found in other picornaviruses. *J Virol* 80, 2006 11827-11832
345. Putman TE, Suchland RJ, Ivanovitch JD, Rockey DD. Culture-independent sequence analysis of Chlamydia trachomatis in urogenital specimens identifies regions of recombination and in-patient sequence mutations. *Microbiology.* 2013 Oct;159(Pt 10):2109-17
346. Rodríguez-Domínguez M, Puerta T, Menéndez B, González-Alba JM, Rodríguez C, Hellín T, Vera M, González-Sainz FJ, Clavo P, Villa M, Cantón R, Del Romero J, Galán JC. Clinical and epidemiological characterization of a lymphogranuloma venereum outbreak in Madrid, Spain: co-circulation of two variants. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Mar;20(3):219-25
347. Christerson L, de Vries HJ, de Barbeyrac B, Gaydos CA, Henrich B, Hoffmann S, Schachter J, Thorvaldsen J, Vall-Mayans M, Klint M, Herrmann B, Morré SA. Typing of lymphogranuloma venereum Chlamydia trachomatis strains. *Emerg Infect Dis.* 2010 Nov;16(11):1777-9
348. Bax CJ, Quint KD, Peters RP, Ouburg S, Oostvogel PM, Mutsaers JA, Dörr PJ, Schmidt S,

- Jansen C, van Leeuwen AP, Quint WG, Trimbos JB, Meijer CJ, Morré SA. Analyses of multiple-site and concurrent Chlamydia trachomatis serovar infections, and serovar tissue tropism for urogenital versus rectal specimens in male and female patients. *Sex Transm Infect.* 2011 Oct;87(6):503-7
- 349.** Quint KD, Bom RJ, Quint WG, Bruisten SM, van der Loeff MF, Morré SA, de Vries HJ. Anal infections with concomitant Chlamydia trachomatis genotypes among men who have sex with men in Amsterdam, the Netherlands. *BMC Infect Dis.* 2011 Mar 14;11:63
- 350.** Paraskevis D, Pybus O, Magiorkinis G, Hatzakis A, Wensing AM, van de Vijver DA, Albert J, Angarano G, Asjö B, Balotta C, Boeri E, Camacho R, Chaix ML, Coughlan S, Costagliola D, De Luca A, de Mendoza C, Derdelinckx I, Grossman Z, Hamouda O, Hoepelman I, Horban A, Korn K, Kücherer C, Leitner T, Loveday C, Macrae E, Maljkovic-Berry I, Meyer L, Nielsen C, Op de Coul EL, Ormaasen V, Perrin L, Puchhammer-Stöckl E, Ruiz L, Salminen MO, Schmit JC, Schuurman R, Soriano V, Stanczak J, Stanojevic M, Struck D, Van Laethem K, Violin M, Yerly S, Zazzi M, Boucher CA, Vandamme AM; SPREAD Programme. Tracing the HIV-1 subtype B mobility in Europe: a phylogeographic approach. *Retrovirology.* 2009 May 20;6:49
- 351.** Wang Y, Skilton RJ, Cutcliffe LT, Andrews E, Clarke IN, Marsh P. Evaluation of a high resolution genotyping method for Chlamydia trachomatis using routine clinical samples. *PLoS One.* 2011 Feb 11;6(2):e16971
- 352.** Marangoni A, Foschi C, Nardini P, D'Antuono A, Banzola N, Di Francesco A, Ostanello F, Russo I, Donati M, Cevenini R. Chlamydia trachomatis serovar distribution and other sexually transmitted coinfections in subjects attending an STD outpatients clinic in Italy. *New Microbiol.* 2012 Apr;35(2):215-9
- 353.** Fieser N, Simnacher U, Tausch Y, Werner-Belak S, Ladenburger-Strauss S, von Baum H, Reischl U, Essig A. Chlamydia trachomatis prevalence, genotype distribution and identification of the new Swedish variant in Southern Germany. *Infection.* 2013 Feb;41(1):159-66
- 354.** Versteeg B, van Rooijen MS, Schim van der Loeff MF, de Vries HJ, Bruisten SM. No indication for tissue tropism in urogenital and anorectal Chlamydia trachomatis infections using high-resolution multilocus sequence typing. *BMC Infect Dis.* 2014 Aug 26;14:464
- 355.** Millman K, Black CM, Stamm WE, Jones RB, Hook EW 3rd, Martin DH, Bolan G, Tavaré S, Dean D. Population-based genetic epidemiologic analysis of Chlamydia trachomatis serotypes and lack of association between ompA polymorphisms and clinical phenotypes. *Microbes Infect.* 2006 Mar;8(3):604-11
- 356.** Batteiger BE, Wan R, Williams JA, He L, Ma A, Fortenberry JD, Dean D. Novel Chlamydia trachomatis strains in heterosexual sex partners, Indianapolis, Indiana, USA. *Emerg Infect Dis.* 2014 Nov;20(11):1841-7
- 357.** Ochman, H., M. Worobey, C.H. Kuo, et al. 2010. Evolutionary relationships of wild hominids recapitulated by gut microbial communities. *PLoS Biol.* 8: e1000546
- 358.** Brunet M, Guy F, Pilbeam D, Mackaye HT, Likius A, Ahounta D, Beauvilain A, Blondel C, Bocherens H, Boisserie JR, De Bonis L, Coppens Y, Dejax J, Denys C, Düringer P, Eisenmann V, Fanone G, Fronty P, Geraads D, Lehmann T, Lihoreau F, Louchart A, Mahamat A, Merceron G, Mouchelin G, Otero O, Pelaez Campomanes P, Ponce De Leon M, Rage JC, Sapanet M, Schuster M, Sudre J, Tassy P, Valentin X, Vignaud P, Viriot L, Zazzo A, Zollikofer C. A new hominid from the Upper Miocene of Chad, Central Africa. *Nature.* 2002 Jul 11;418(6894):145-51
- 359.** Read, T.D., Joseph, S.J., Didelot, X., Liang, B., Patel, L., Dean, D., 2013. Comparative analysis of Chlamydia psittaci genomes reveals the recent emergence of a pathogenic lineage with a broad host range. *MBio* 4, e00604–e00612.
- 360.** Pannekoek Y, Dickx V, Beekman DSA, Jolley KA, et al. (2010) Multi Locus Sequence Typing of Chlamydia Reveals an Association between Chlamydia psittaci Genotypes and Host Species. *PLoS ONE* 5(12): e14179
- 361.** Gil R, Silva FJ, Peretó J, Moya A. Determination of the core of a minimal bacterial gene set. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004 Sep;68(3):518-37
- 362.** Juan Carlos Galán, Roberto Alonso, José Gutiérrez Fernández, Mario Rodríguez-Domínguez, Jesús B Salinas, Sara Sanbonmatsu Gámez. *Procedimientos en Microbiología Clínica* (nº44). Diagnóstico microbiológico de las infecciones por Chlamydia spp. y especies relacionadas. Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón. Organismo solicitante: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2012
- 363.** Hatch TP. Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae? *J Bacteriol.* 1996 Jan;178(1):1-5.
- 364.** Hogan RJ, Mathews SA, Mukhopadhyay S, Summersgill JT, Timms P. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect Immun.* 2004 Apr;72(4):1843-55
- 365.** Skilton RJ, Cutcliffe LT, Barlow D, Wang Y, Salim O, Lambden PR, Clarke IN. Penicillin induced persistence in Chlamydia trachomatis: high quality time lapse video analysis of the developmental cycle. *PLoS One.* 2009 Nov 6;4(11):e7723.
- 366.** Brooks B, Patel R; European Collaborative Clinical Group (ECCG). The 2012 International Union against Sexually Transmitted Infections European Collaborative Clinical Group report on

the diagnosis and management of *Neisseria gonorrhoeae* infections in Europe. *Int J STD AIDS*. 2013 Jun;24(6):419-22

**367.** Kramer MJ, Gordon FB. Ultrastructural analysis of the effects of penicillin and chlortetracycline on the development of a genital tract *Chlamydia*. *Infect Immun*. 1971 Feb;3(2):333-41

**368.** Pilhofer M1, Aistleitner K, Biboy J, Gray J, Kuru E, Hall E, Brun YV, VanNieuwenhze MS, Vollmer W, Horn M, Jensen GJ. Discovery of chlamydial peptidoglycan reveals bacteria with mureinsacculi but without FtsZ. *Nat Commun*. 2013;4:2856. doi: 10.1038/ncomms3856.

**369.** Jacquier N, Viollier PH, Greub G. The role of peptidoglycan in chlamydial cell division: towards resolving the chlamydial anomaly. *FEMS Microbiol Rev*. 2015Mar;39(2):262-75

**370.** Klöckner A, Otten C, Derouaux A, Vollmer W, Bühl H, De Benedetti S, Münch D, Josten M, Mölleken K, Sahl HG, Henrichfreise B. AmiA is a penicillin target enzyme with dual activity in the intracellular pathogen *Chlamydia pneumoniae*. *Nat Commun*. 2014 Jun 23;5:4201. doi: 10.1038/ncomms5201.

**371.** Wang Y1, Kahane S, Cutcliffe LT, Skilton RJ, Lambden PR, Clarke IN. Development of a transformation system for *Chlamydia trachomatis*: restoration of glycogen biosynthesis by acquisition of a plasmid shuttle vector. *PLoS Pathog*. 2011 Sep;7(9):e1002258.

**372.** Ciccarelli FD, Doerks T, von Mering C, Creevey CJ, Snel B, Bork P. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science*. 2006 Mar3; 311(5765):1283-7.

**373.** Wagner M, Horn M. 2006. The Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sisterphyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. *Curr Opin Biotechnol*. 17:241-249.

**374.** Kamneva OK, Liberles DA, Ward NL. 2010. Genome-wide influence of indel substitutions on evolution of bacteria of the PVC superphylum, revealed using a novel computational method. *Genome Biol Evol*. 2:870-886.

**375.** Corsaro D, Greub G. Pathogenic potential of novel *Chlamydiae* and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19:283-297.

**376.** Everett, K.D., R.M. Bush, and A.A. Andersen, Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol*. 1999. 49 Pt 2: p. 415-40

**377.** Letunic I Interactive tree of life: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *NAR* 2011

**378.** Collingro A, Tischler P, Weinmaier T, Penz T, Heinz E, Brunham RC, Read TD, Bavoi PM, Sachse K, Kahane S, Friedman MG, Rattei T, Myers GS, Horn M. Unity in variety--the pan-genome of the Chlamydiae. *Mol Biol Evol*. 2011 Dec;28(12):3253-70.

**379.** Brinkman, F.S., J.L. Blanchard, A. Cherkasov, et al. 2002. Evidence that plant-like genes in *Chlamydia* species reflect an ancestral relationship between Chlamydiaceae, cyanobacteria, and the chloroplast. *Genome Res*. 12: 1159-1167.

**380.** Bachmann NL, Polkinghorne A, Timms P. *Chlamydia* genomics: providing novel insights into chlamydial biology. *Trends Microbiol*. 2014 Aug;22(8):464-72

**381.** Thomas NS, Lusher M, Storey CC, Clarke IN (1997) Plasmid diversity in *Chlamydia*. *Microbiology* 143: 1847-1854.

**382.** Ferreira R, Borges V, Nunes A, Borrego MJ, Gomes JP (2013) Assessment of the load and transcriptional dynamics of *Chlamydia trachomatis* plasmid according to strains' tissue tropism. *Microbiol Res* 168: 333-339.

**383.** Rockey DD (2011) Unraveling the basic biology and clinical significance of the chlamydial plasmid. *J Exp Med* 208: 2159-2162

**384.** Seth-Smith HM, Harris SR, Skilton RJ, Radebe FM, Golparian D, Shipitsyna E, Duy PT, Scott P, Cutcliffe LT, O'Neill C, Parmar S, Pitt R, Baker S, Ison CA, Marsh P, Jalal H, Lewis DA, Unemo M, Clarke IN, Parkhill J, Thomson NR. Whole-genome sequences of *Chlamydia trachomatis* directly from clinical samples without culture. *Genome Res*. 2013 May;23(5):855-66

**385.** Joseph SJ, Li B, Ghonasgi T, Haase CP, Qin ZS, Dean D, Read TD. Direct amplification, sequencing and profiling of *Chlamydia trachomatis* strains in single and mixed infection clinical samples. *PLoS One*. 2014 Jun 27;9(6):e99290

**386.** Christiansen MT, Brown AC, Kundu S, Tutill HJ, Williams R, Brown JR, Holdstock J, Holland MJ, Stevenson S, Dave J, Tong CY, Einer-Jensen K, Depledge DP, Breuer J. Whole-genome enrichment and sequencing of *Chlamydia trachomatis* directly from clinical samples. *BMC Infect Dis*. 2014 Nov 12;14:591

**387.** Carlson JH, Whitmire WM, Crane DD, Wicke L, Virtaneva K, Sturdevant DE, Kupko JJ 3rd, Porcella SF, Martinez-Orengo N, Heinzen RA, Kari L, Caldwell HD. The *Chlamydia trachomatis* plasmid is a transcriptional regulator of chromosomal genes and a virulence factor. *Infect Immun*. 2008 Jun;76(6):2273-83

**388.** Song L, Carlson JH, Whitmire WM, Kari L, Virtaneva K, Sturdevant DE, Watkins H, Zhou B, Sturdevant GL, Porcella SF, McClarty G, Caldwell HD. *Chlamydia trachomatis* plasmid-encoded Pgp4 is a transcriptional regulator of virulence-associated genes. *Infect Immun*. 2013 Mar;81(3):636-44

- 389.** Last AR, Roberts Ch, Cassama E, Nabicassa M, Molina-Gonzalez S, Burr SE, Mabey DC, Bailey RL, Holland MJ. Plasmid copy number and disease severity in naturally occurring ocular *Chlamydia trachomatis* infection. *J Clin Microbiol.* 2014 Jan;52(1):324-7 293.
- 390.** Hayes LJ, Yearsley P, Treharne JD, Ballard RA, Fehler GH, Ward ME. Evidence for naturally occurring recombination in the gene encoding the major outer membrane protein of lymphogranuloma venereum isolates of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 1994 Dec;62(12):5659-63
- 391.** Binet, R., and A. T. Maurelli. 2009. Transformation and isolation of allelic exchange mutants of *Chlamydia psittaci* using recombinant DNA introduced by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:292–297.
- 392.** Bachmann NL, Polkinghorne A, Timms P. *Chlamydia* genomics: providing novel insights into chlamydial biology. *Trends Microbiol.* 2014 Aug;22(8):464-72
- 393.** Klint, M., Fuxelius, H.H., Goldkuhl, R.R., Skarin, H., Rutemark, C., Andersson, S.G., Persson, K., Herrmann, B., 2007. High-resolution genotyping of *Chlamydia trachomatis* strains by multilocus sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1410-1414.
- 394.** Dean, D., Kandel, R.P., Adhikari, H.K., Hessel, T., 2008. Multiple *Chlamydiaceae* species in trachoma: implications for disease pathogenesis and control. *PLoS Med.* 5, e14.
- 395.** Herrmann B, Isaksson J, Ryberg M, Tångrot J, Saleh I, Versteeg B, Gravningen K, Bruisten S. Global multilocus sequence type (MLST) analysis of *Chlamydia trachomatis* strains from 16 countries. *J Clin Microbiol.* 2015 Apr 29. pii:
- 396.** Yang, C.L., Maclean, I., Brunham, R.C., 1993. DNA sequence polymorphism of the *Chlamydia trachomatis* *omp1* gene. *J. Infect. Dis.* 168, 1225–1230
- 397.** Borges V, Gomes JP. Deep comparative genomics among *Chlamydia trachomatis* lymphogranuloma venereum isolates highlights genes potentially involved in pathoadaptation. *Infect Genet Evol.* 2015 Jun;32:74-88.
- 398.** Turrientes MC, González-Alba JM, del Campo R, Baquero MR, Cantón R, Baquero F, Galán JC. Recombination blurs phylogenetic groups routine assignment in *Escherichia coli*: setting the record straight. *PLoS One.* 2014 Aug 19;9(8):e105395.
- 399.** Abdelsamed H, Peters J, Byrne GI. Genetic variation in *Chlamydia trachomatis* and their hosts: impact on disease severity and tissue tropism. *Future Microbiol.* 2013 Sep;8(9):1129-46
- 400.** Dean D, Bruno WJ, Wan R, Gomes JP, Devignot S, et al. (2009) Predicting phenotype and emerging strains among *Chlamydia trachomatis* infections. *Emerg Infect Dis* 15: 1385–94.
- 401.** Herrmann B, Isaksson J, Ryberg M, Tångrot J, Saleh I, Versteeg B, Gravningen K, Bruisten S. Global Multilocus Sequence Type Analysis of *Chlamydia trachomatis* Strains from 16 Countries. *J Clin Microbiol.* 2015 Jul;53(7):2172-9.

